

**Einfluß zellulärer Mutationen auf die
PhiX174 Protein E-induzierte Lyse
von Escherichia coli**

Gabriele Halfmann

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0038

Einfluß zellulärer Mutationen auf die PhiX174 Protein E-induzierte Lyse von Escherichia coli

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Gabriele Halfmann
aus Otterbach/Pfalz
im Dezember 1988**

durchgeführt am

Institut für Mikrobiologie der Universität Kaiserslautern
Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München
Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Wien

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Werner Lubitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Schmieger

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 4. 1989

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

I.	Einleitung.....	1
1.	Lebenszyklus des Bakteriophagen PhiX174.....	1
2.	Genomorganisation des Phagen PhiX174.....	1
3.	Regulation der Genexpression von PhiX174.....	3
4.	Funktionelle Charakterisierung von Protein E.....	4
5.	Einfluß zellulärer Faktoren auf die Protein E-induzierte Lyse von E. coli.....	5
6.	Problemstellung.....	6
II.	Material.....	8
1.	Bakterien.....	8
1.1	E. coli K12.....	8
1.2	E. coli C.....	11
1.3	Staphylococcus carnosus.....	11
1.4	Konstruierte E. coli Stämme.....	11
2.	Bakteriophagen.....	12
3.	Plasmide.....	13
4.	Medien.....	13
5.	Puffer und Lösungen.....	14
6.	Chemikalien.....	15
III.	Methoden.....	17
1.	Mikrobiologische Methoden.....	17
1.1.	Wachstums- und Lysetests.....	17
1.2.	Phagentiter und Phagenvermehrung.....	17
1.2.1.	PhiX174.....	17
1.2.2.	P1.....	18
1.2.3.	Lambda NK55.....	18
2.	Genetische Methoden.....	19
2.1.	Transposonmutagenese mit Tn10 und Eliminierung von Tn10.....	19
2.2.	Transduktion.....	19
2.3.	Konjugation.....	19
2.4.	F'-Faktor-Kreuzungen.....	19

2.5.	Test genetischer Marker.....	20
3.	Molekularbiologische Methoden.....	20
3.1.	Transformation.....	20
3.1.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	20
3.1.2.	Transformation von <i>Staphylococcus carnosus</i>	20
3.1.2.1.	Protoplastenbildung.....	20
3.1.2.2.	Protoplastentransformation.....	21
3.2.	Präparation von DNA.....	21
3.2.1.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	21
3.2.1.1.	Minilysate.....	21
3.2.1.2.	Reinigung von Plasmid-DNA über CsCl-Gradienten.....	21
3.2.2.	Präparation von Φ X174 RF-DNA.....	21
3.2.3.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.2.4.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Staphylococcus carnosus</i>	22
3.3.	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>E. coli</i>	23
3.4.	Enzymreaktionen mit DNA.....	23
3.4.1.	Verdau durch Restriktionsenzyme.....	23
3.4.2.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	23
3.4.3.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	23
3.4.4.	Phosphorylierung von synthetischen Linkern.....	23
3.4.5.	Nick-Translation.....	23
3.5.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	24
3.6.	Anlegen einer Genbank mit chromosomaler DNA von <i>E. coli</i>	24
3.6.1.	Präparation von 30-45 kb DNA-Fragmenten aus chromosomaler <i>E. coli</i> -DNA.....	24
3.6.2.	Ligation chromosomaler DNA-Fragmente mit dem Cosmidvektor pH Φ C79 und Lambda <i>in vitro</i> Verpackung.....	24
3.6.3.	Titration der Cosmid-Genbank.....	25
4.	Gelelektrophoresen.....	25
4.1.	DNA-Gelelektrophoresen.....	25
4.1.1.	Agarosegelelektrophorese.....	25
4.1.2.	PAA-Gele.....	25
4.2.	Proteingelelektrophorese.....	25
5.	Radioaktive Markierung von Proteinen.....	25
6.	Immunoblot (Western-Analyse).....	26
7.	DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Analyse).....	26
8.	RNA-DNA-Hybridisierung (Northern-Analyse).....	27
9.	Koloniehybridisierung.....	27
10.	Aufschluß von Zellen durch Lysozym/EDTA.....	27
11.	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität.....	27
12.	Induktion von Autolyse.....	27
12.1.	EDTA-Schock.....	27
12.2.	Induktion von Autolyse mit Moenomycin.....	28
13.	Computerprogramme.....	28

IV.	Ergebnisse.....	29
A.	Einfluß zellulärer Mutationen auf die Protein E-Induzierte Lyse von <i>E. coli</i>.....	29
1.	Untersuchungen an der temperatursensitiven- β -Lactam-toleranten <i>lytB</i> Mutante von <i>E. coli</i>	29
1.1.	Effekt von Φ X174 K9-Infektion auf das Wachstum von <i>E. coli</i> VC44 bei 30°C und 42°C	29
1.2.	Effekt von Chloramphenicol und Kanamycin auf <i>E. coli</i> VC44 nach Φ X174 K9-Infektion bei 30°C und 42°C.....	32
1.3.	Phagenentwicklung von Φ X174 K9 in infizierten <i>E. coli</i> VC44 Zellen bei restriktiver Temperatur	34
1.4.	Effekt von NaCl auf die phänotypische Toleranz von <i>E. coli</i> VC44 nach Infektion mit Φ X174 K9.....	35
1.5.	Lyse von <i>E. coli</i> VC44 nach Expression des klonierten Φ X174 Gen E	36
2.	Expression von Φ X174 Gen E in der <i>E. coli</i> <i>wee</i> Mutante	38
B.	Isolierung und genetische Charakterisierung von <i>pxlA</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	41
1.	Isolierung von Φ X174 Protein E lyseresistenten (<i>pxl</i>) Mutanten von <i>E. coli</i>	42
1.1.	Lyse von <i>E. coli</i> nach Expression des klonierten Gen E und Isolierung von <i>pxl</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	42
1.2.	Physiologische Charakterisierung von <i>E. coli</i> <i>pxl</i> Mutanten.....	43
2.	Lokalisation der <i>pxlA</i> Mutation auf dem Chromosom von <i>E. coli</i> GH11A	45
2.1.	Entfernen des Plasmids pUH23 aus <i>pxl</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	45
2.2.	Transformationseffizienz der Plasmide pSB12 und pUH12 in <i>E. coli</i> GH11A	45
2.3.	Transposonmutagenese von <i>E. coli</i> GH11A mit <i>Tn10</i>	47
2.4.	F'-Komplementationsanalyse der <i>pxlA</i> Mutation	47
2.5.	Kartierung der <i>pxlA</i> Mutation durch Chromosomentransfer.....	50
2.6.	Kartierung der <i>pxlA</i> Mutation durch P1-Transduktion.....	53
2.6.1.	Zwei-Faktor-Kreuzung.....	53
2.6.2.	Drei-Faktor-Kreuzung	55
C.	Untersuchungen zur molekularen Ursache der Resistenz von <i>E. coli</i> <i>pxlA</i> Mutanten nach Expression von Plasmidkodiertem Gen E	58
1.	Nachweis der plasmidkodierten Gen E Expression in <i>pxlA</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	59
1.1.	Komplementation der Φ X174 Δ m3 Mutation durch das plasmidkodierte Gen E in <i>pxlA</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	59
1.2.	Nachweis von plasmidkodiertem Protein E in <i>pxlA</i> Mutanten von <i>E. coli</i> mittels SDS-PAGE und Immunoblot.....	61
2.	Nachweis von Protein D und Protein E in <i>pxlA</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	61
2.1.	Wachstum von <i>E. coli</i> <i>pxl</i> ⁺ und <i>pxlA</i> nach Expression der Gene D und E vom Plasmid pSB35.....	63

2.2.	Nachweis der plasmidkodierten Proteine von Plasmid pSB12 und pSB35 in <i>E. coli pxi⁺</i> und <i>pxiA</i>	63
2.3.	Quantifizierung der Proteine D und E nach Expression vom Plasmid pSB35 in <i>E. coli pxi⁺</i> und <i>pxiA</i>	66
3.	Transkriptanalysen der Lambda PL-spezifischen mRNA von Plasmid pSB35 in <i>E. coli pxi⁺</i> und <i>pxiA</i>	67
3.1.	Kinetik der Lambda PL-GenD/E -spezifischen mRNA von Plasmid pSB35 in <i>E. coli pxi⁺</i> und <i>pxiA</i>	67
3.1.1.	Nachweis der PL-GenD/E-spezifischen mRNA in <i>E. coli pxi⁺</i>	67
3.1.2.	Nachweis der PL-GenD/E-spezifischen mRNA in <i>pxiA</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	70
3.2.	Quantifizierung der PL-GenD/E-spezifischen mRNA in <i>E. coli pxi⁺</i> und <i>pxiA</i>	73
3.2.1.	Quantifizierung der Lambda PL-GenD/E-mRNA in <i>E. coli pxi⁺</i>	73
3.2.2.	Quantifizierung der Lambda PL-GenD/E-mRNA in <i>E. coli pxiA</i> Mutanten	76
4.	Identifizierung der verschiedenen mRNAs in <i>E. coli pxi⁺</i> und <i>pxiA</i> durch Hybridisierung mit PhIX174 DNA-Fragmenten	79
4.1.	Analyse der mRNA-Klassen in <i>E. coli pxi⁺</i> nach Transkription von PL-GenD/E-mRNA vom Plasmid pSB35	79
4.2.	Analyse der mRNA-Klassen in <i>E. coli pxiA</i> nach Transkription von PL-GenD/E-mRNA vom Plasmid pSB35	85
5.	Untersuchungen zur Sekundär- und Tertiärstruktur Gen D/E-spezifischer mRNA	86
6.	Quantifizierung der β -Galaktosidaseaktivität nach Expression des lacZ Gens vom Plasmid pSB85-1 in <i>E. coli pxiA</i>	94
D.	Klonierung der <i>pxiA</i>-Sequenz	96
1.	Klonierungsstrategie	96
2.	"Shot-gun"-Klonierung der <i>pxiA</i> -Sequenz	97
3.	Subklonierung von <i>pxiA</i> in Plasmid pBR322	97
4.	Nachweis des Genprodukts von <i>pxiA</i>	100
5.	Rückhybridisierung des klonierten <i>pxiA</i> DNA-Segments mit chromosomaler DNA aus <i>E. coli pxi⁺</i> und <i>pxiA</i>	100
6.	Klonierung des <i>pxi⁺</i> Wildtyp-Allels	102
E.	Einfluß der klonierten <i>pxiA</i>-Sequenz auf die Gen E und Gen D Expression in <i>E. coli</i>	108
1.	Konstruktion von Plasmid pGH36	108
2.	Expression von Gen E vom Plasmid pAW13 und von Gen D und E gemeinsam vom Plasmid pGH36 im <i>pxiA</i> Hintergrund von Plasmid pGH81	110
3.	Nachweis der Gen E- und Gen D-spezifischen Translationsprodukte nach Expression vom Plasmid pGH36 in Anwesenheit der klonierten <i>pxiA</i> -Sequenz	112
4.	Nachweis PL-GenD/E-spezifischer mRNA nach Induktion der Genexpression vom Plasmid pGH36 unter Einfluß des klonierten <i>pxiA</i> -Segments in Plasmid pGH81	114

F.	Wachstumsabhängige Stabilität der Gen E-spezifischen mRNA in <i>E. coli</i> pxl^+	117
1.	Nachweis von Protein D und Protein E nach Expression vom Plasmid pGH36 in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von <i>E. coli</i>	117
2.	Nachweis der PL-GenE-mRNA in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von <i>E. coli</i>	119
2.1.	Kinetik der PL-GenE-mRNA in in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von <i>E. coli</i>	119
2.2.	Nachweis der erhöhten Prozessierung von PL-GenD/E-mRNA in stationärer Wachstumsphase von <i>E. coli</i>	122
G.	Heterologe Expression von PhiX174 Gen E in <i>Staphylococcus carnosus</i>	124
1.	Klonierung von Gen E in den <i>E. coli</i> /B. subtilis "Shuttle"-Vektor pSI-I	124
1.1.	Konstruktion von Plasmid pGH1	125
2.	Expression von Gen E vom Plasmid pGH1 in <i>E. coli</i> und <i>Staphylococcus carnosus</i>	129
V.	Diskussion	133
	Zelluläre Einflüsse auf die Protein E-induzierte Lyse von <i>E. coli</i>	133
	Isolierung und Charakterisierung von <i>pxlA</i> Mutanten von <i>E. coli</i>	134
	Struktur der <i>pxlA</i> Sequenz und ihrer genomischen Umgebung	134
	Molekulare Ursache der phänotypischen Resistenz von <i>pxlA</i> Mutanten nach Expression der letalen Gen E-Funktion	135
	Erhöhte Prozessierung von PL-GenD/E-spezifischer mRNA in stationärer Wachstumsphase von <i>E. coli</i>	145
	Einfluß der <i>pxlA</i> Mutation auf die Lyse von <i>E. coli</i> nach PhiX174 Infektion	148
	Heterologe Expression von Gen E in grampositiven Bakterien	149
	Zusammenfassung	150
VI.	Literaturverzeichnis	152
	Anhang	163
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungen

am	amber
Amp	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cat	Chloramphenicolacetyltransferase
C	Grad Celsius
cfu	Colony forming units
Ci	Curie
DNA	Deoxyribonucleic Acid
D	Dalton
dNTP	Dideoxyribonukleotidtriphosphat
DEP	Diethylpyrophosphat
DTE	Dithioeritol
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
k	kilo-
kan	Kanamycin-Resistenz
rpm	Rotationen pro Minute
l	Liter
lac i	lac-Repressor Gen
lac o	lac-Operator
lac p	lac-Promotor
lacZ	β -Galaktosidase Gen
Lambda P_L	linksseltiger Promotor von Lambda
m	milli
min	Minute
M	Molar
m.o.i.	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA

O.D.	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pfu	Plaques forming units
p.o.o.	point of origin (Übertragungspunkt)
P_L-GenD/E	Gen D und Gen E unter transkriptioneller Kontrolle von Lambda P _L
P_L-GenE	Gen E unter transkriptioneller Kontrolle von Lambda P _L
P_{Lac}-GenE	Gen E unter transkriptioneller Kontrolle der lac po-Region
P_{Spac}	Hybridpromotor
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
Tet	Tetracyclinresistenz
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
tRNA	transfer RNA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
wt	Wildtyp

I. Einleitung

1. Lebenszyklus des Bakteriophagen PhiX174

Der Infektionszyklus des Bakteriophagen PhiX174 beginnt mit der Adsorption der Phagenpartikel an spezifische Lipopolysaccharid-Rezeptoren von *E. coli* (Feige und Stirn 1976). Elektronenmikroskopisch konnte ferner gezeigt werden, daß an den Adsorptionsstellen die äußere und innere Membran eng miteinander verbunden sind (Bayer und Starkey 1972). Nach Infektion wird die einzelsträngige(ss)-DNA durch Wirtsenzyme zur doppelsträngigen(ds)-DNA ergänzt. Die DNA-Replikation erfolgt über den "rolling-circle"-Mechanismus und wird durch das virale Protein A initiiert (Kornberg 1980). Im späten Infektionsstadium, wenn alle virale Genprodukte vorhanden sind, wird PhiX174 ss-DNA in Prokapside verpackt. Das sehr basische Protein J fungiert als DNA-kondensierendes Protein während der Verpackung der viralen DNA in den Phagenkopf (Freymeyer et al., 1977). Die viralen Hüllproteine werden durch die Gene F, G und H codiert (Shank et al., 1977). Das Kapsid wird durch 60 Proteine F gebildet, wobei an den 12 Ecken des Ikosaeders die Proteine G und H jeweils Spikes ausbilden. Die Proteine B, C und D führen während der Bildung der Kapsiduntereinheiten und der Phagenreifung Hilfsfunktionen aus. Das Gen D Produkt stellt dabei das Gerüstprotein bei der Virus-Assemblierung dar (Fujisawa und Hayashi 1977). Am Ende des PhiX174 Infektionszyklus erfolgt die Zellyse von *E. coli* durch das virale Lyseprotein E, wobei es zur Freisetzung von ungefähr 200-300 reifen Phagen kommt (Hutchison und Sinsheimer 1966).

2. Genomorganisation des Phagen PhiX174

PhiX174 besitzt als Genom einen geschlossenen einzelsträngigen DNA-Ring (Sinsheimer 1959, Benbow et al., 1971) aus 5386b (Sanger et al., 1978), der für 11 Genprodukte codiert (Fig. 1).

Die Gene B, K und E überlappen mit den Genen A, C und D derart, daß diese 6 nicht-strukturellen Gene nur 45% des gesamten Genoms überdecken. Jedes Basenpaar in diesen Regionen wird für die Proteinkodierung ausgenutzt. Die verbleibenden 55% des Genoms (strukturelle Domäne) enthalten die Gene der vier Kapsid-Proteine J, F, G und H, die untereinander durch nicht-translatierte Bereiche - intercistronische Regionen - getrennt sind. Der Unterschied in der Organisation zwischen strukturellen und nicht-strukturellen Genen wird durch die unterschiedliche Verteilung zur Ausbildung potentieller Sekundärstrukturen von DNA und RNA ausgeglichen. Es wurde gezeigt, daß die Verteilung von statistisch signifikanten hair-pins mit wesentlich höherer Frequenz in strukturellen als in nicht-strukturellen Domänen des Genoms auftreten, und daß sie in intercistronischen Regionen überrepräsentiert sind (Müller und Fitch 1981, Müller und Fitch 1982). Sie stellen wichtige Signale in der Regulation der Phagen-Genexpression dar (Wells et al., 1980).

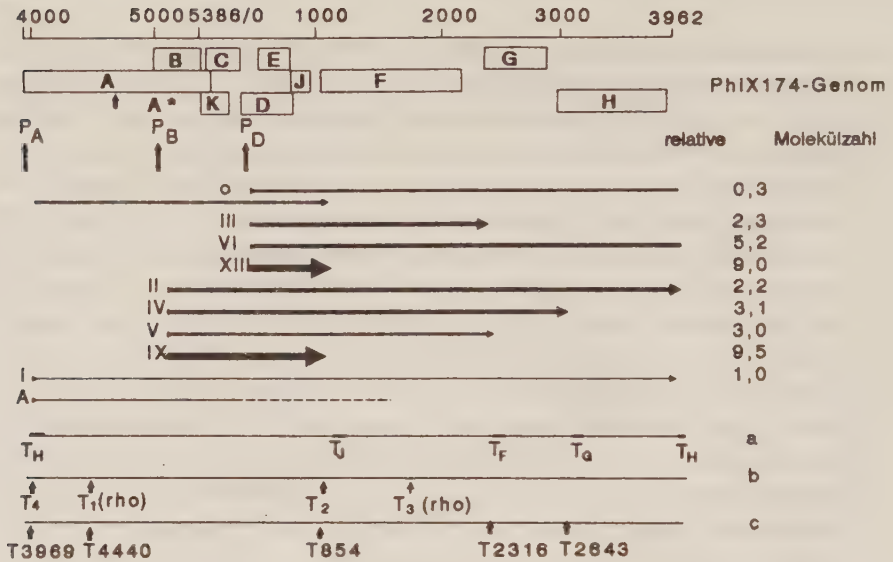


Fig. 1 Genkarte von PhiX174 und Orientierung der mRNAs

Die obere Linie zeigt die Nukleotidposition auf dem PhiX174 Genom nach der Sequenz von Sanger et al. (1978). Die offenen Rechtecke geben die Gene in den drei Leserahmen wieder und stellen das Genarrangement dar. Die senkrechten Pfeile zeigen die Hauptpromotoren (P_A , P_B , P_D) der PhiX174 DNA. Die Linien a-c geben die vermuteten Stellen für die Transkriptionstermination an. Pfeile mit römischen Ziffern (I bis XIII) und mit O und A geben die in vivo Transkripte der PhiX174 mRNA nach Hayashi et al. (1976) wieder, wobei die Dicke der Pfeile proportional zur mRNA-Verteilung dargestellt ist. Die relative Molekülzahl der einzelnen mRNAs wurde in Bezug zur mRNA I berechnet (Hayashi et al., 1976).

Linie a: in vivo Terminationsstellen nach Hayashi et al. (1976).

Linie b: in vitro Terminationsstellen nach Axelrod (1976).

Linie c: Terminationsstellen nach Computervorhersagen von McMahon und Tinoco (1978)

3. Regulation der Genexpression von PhIX174

Die Transkription der viralen Gene startet an 3 Promotoren, die vor den Genen A, B und D liegen (Smith und Sinsheimer 1976, Axelrod 1976). Hayashi et al. (1976) fanden, daß von diesen Promotoren ausgehend *in vivo* 10 verschiedene polycistronische mRNAs unidirektional synthetisiert werden (Fig. 1). Clements und Sinsheimer (1975) konnten nach Hybridisierungsversuchen zusätzlich 8 und durch eine doppelte Markierungsmethode mit ^{32}P - und ^{33}P -UTP weitere 7 PhIX174 mRNA-Spezies in infizierten Zellen nachweisen.

Die Signale für die Transkriptionstermination sind in jedem der 4 Intercistronischen Bereiche lokalisiert. Die *in vivo* Transkriptionskarte (Hayashi et al., 1976) zeigt Terminatoren hinter den Genen J, F, G und H (T_J , T_F , T_G und T_H). Zwei der vier Terminatoren T_J (T_2) und T_H (T_4) sind auch *in vitro* funktionell (Axelrod 1976) und rho-unabhängig. Termination an T_J , T_F und T_G ist *in vivo* während aktiver Proteinsynthese ebenfalls rho-unabhängig; wird die Proteinsynthese durch Chloramphenicol gehemmt, so erfolgt die Termination jedoch rho-abhängig (Hayashi et al., 1981a). Von McMahon und Tinoco (1978) wurden nach Computer-Analysen der Duplex-Stabilität fünf mögliche Terminationssequenzen gefunden, die Übereinstimmung mit den Terminationsstellen T_1 , T_J (T_2), T_F , T_G und T_H (T_4) zeigten (Fig. 1). Die Termination an diesen Stellen ist jedoch nicht vollständig; die Effizienz der Termination an T_J , T_F und T_G ist zwischen 40% und 60%. Am stärksten Terminator T_H beträgt die Effizienz etwa 90% (Hayashi et al., 1981a).

Aus dieser unterschiedlichen Transkriptionstermination resultiert, daß alle PhIX174 Gene auf mehreren mRNA-Klassen vorkommen. Neben der Anzahl der auftretenden mRNA-Spezies variiert die strukturelle und funktionelle Stabilität der mRNA-Klassen mit Halbwertszeiten zwischen 4, 5 und 11 Minuten (Hayashi et al., 1976). Im Gegensatz zu großen Bakteriophagen wie T3, T4, T7 und Lambda, bei denen zwischen früher und später Transkription unterschieden werden kann (Krüger und Schroeder 1981), besitzt PhIX174 keine kodierenden Gene, die regulatorische Effektoren der Transkription oder Translation darstellen (Pollock 1977). Alle PhIX174 mRNAs werden zu frühen und späten Zeitpunkten im Infektionszyklus in gleichen Konzentrationen gebildet. Die relative Moleküzahl der verschiedenen mRNAs ist in Fig. 1 wiedergegeben. Da keine zeitliche Regulation der Genexpression beobachtet wurde, blieb ungeklärt, wie es zur unterschiedlichen Translationseffizienz, in der die 11 PhIX174 spezifischen Polypeptide gemacht werden, kommt.

Von den 10 *in vivo* transkribierten mRNA-Spezies kodiert jede für die Gene D und E (Fig. 1). Protein E wird jedoch im Vergleich zu Protein D in sehr viel geringeren molaren Mengen gebildet (Pollock et al., 1978, Bläsi 1987). Für die Lyse der Zellen werden nur etwa 100-1000 Moleküle pro Zelle benötigt (Maratea et al., 1985). Zur Verhinderung einer frühzeitigen Lyse der Wirtszellen durch Protein E ist eine strenge Regulation der Gen E Expression oder eine Funktionskontrolle von Protein E notwendig. Durch Analyse der Gen D- und E-spezifischen mRNA und der Proteine D und E sollte in der vorliegenden Arbeit bessere Einsicht in die molekularen Zusammenhänge der Regulation der Gen E Expression (transkriptional, translation oder posttranslational) erhalten werden.

Untersuchungen über intramolekulare Basenpaarungen der PhiX174 ss-DNA ergaben, daß das Gen E Startcodon innerhalb einer gepaarten Sequenz liegt (Edlind und Ihler 1980). Es wurde vermutet, daß eine Zugänglichkeit der Gen E-Ribosomenbindungsstelle für Ribosomen nur auf solchen PhiX174 mRNAs erfolgen kann, bei denen diese gepaarten Sequenzen fehlen. Da die Gene D und E gemeinsam von der häufigsten PhiX174 mRNA-Klasse XIII translatiert werden, wurde ein zusätzlicher translationaler Kontrollmechanismus für die Gen E-Expression angenommen (Edlind und Ihler 1980). Eine translationale Kopplung von Gen D und Gen E konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Gen E-Expression durch gleichzeitige Expression des darunter liegenden Gens D nicht beeinträchtigt wird (Bläsi 1987). Es wurde vielmehr vermutet, daß die Kontrolle der Gen E-Expression auf translationaler Ebene aufgrund einer "schwachen" Ribosomenbindungsstelle erfolgt (Bläsi 1987). Da weiter nicht auszuschließen ist, daß zelluläre Funktionen die Gen E-Expression beeinflussen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Gen E Expressionsstudien an E. coli Protein E-resistenten Mutanten durchgeführt.

4. Funktionelle Charakterisierung von Protein E

Die essentielle Funktion von Protein E für die Zellyse wurde erstmalig durch lysenegative Phagenmutanten (PhiX174am3) gezeigt (Hutchison und Sinsheimer 1966). PhiX174am3-Infektion von E. coli führt zur Bildung von reifen Phagenpartikeln, ohne daß die Zellen lysiert werden. Mutationen, die diesen Phänotyp hervorrufen, wurden auf der PhiX174 DNA-Sequenz, die für Gen E kodiert, lokalisiert (Barrell et al., 1978).

Durch Klonierung und kontrollierte Expression von Gen E wurde nachgewiesen, daß Protein E allein in der Lage ist, die Lyse von E. coli hervorzurufen (Henrich et al., 1982, Young und Young 1982).

In PhiX174 infizierten Zellen konnte Protein E mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 10 kD nachgewiesen werden (Barrell et al., 1976, Pollock et al., 1978). Protein E stellt ein basisches Protein dar, das aus 91 Aminosäuren besteht und an seinem N-Terminus sehr hydrophobe Sequenzen besitzt. Barrell et al. (1976) vermuteten aufgrund der hydrophoben Sequenzen eine membranassoziiierende Funktion von Protein E. Veränderungen im Proteinstil von innerer und äußerer Membran von E. coli nach PhiX174 Infektion ließen eine Interaktion von Protein E mit der Zellhülle vermuten (Lubitz et al., 1981). Diese Annahme wurde durch den Nachweis von Protein E in Zellwand-Fractionen PhiX174 infizierter Zellen (Altman et al., 1985) und nach Expression des klonierten Gen E (Bläsi et al., 1983) in der inneren und äußeren Membran von E. coli bestätigt.

Aufgrund der Integration von Protein E in den Zellwandkomplex kommt es zur Induktion zellulärer Phospholipaseaktivität (Lubitz und Pugsley 1985), sowie zu einem limitierten Abbau von Murein (Lubitz und Plapp 1980). Eine eigene enzymatische Aktivität des Lyseproteins konnte allerdings schon früh ausgeschlossen werden (Markert und Zillig 1965, Eigner et al., 1963).

Untersuchungen von 5'-seitig verkürztem Gen E zeigten, daß die endständigen 9 Codons des Gens ohne Funktionsverlust deletiert werden können (Schüller et al., 1985). Protein E-Fusionsstudien

ergaben, daß die ersten 59 Codons von Gen E die Sequenzen enthalten, die für die lytische Eigenschaft des Proteins verantwortlich sind (Maratea et al., 1985). Die lytische Funktion von Gen E C-terminalen Deletionsmutanten konnte durch Fusionen mit oligomerisierenden Strukturen (lacZ, cat und tetA) wiederhergestellt werden (Maratea et al., 1985, Buckley und Hayashi 1986). Aufgrund der durchgeführten Fusionsstudien könnte daher dem N-terminalen Bereich des Proteins die funktionelle Region, die zu seiner letalen Wirkung führt, zugeordnet werden und abgeleitet werden, daß der C-terminale Bereich möglicherweise für eine Oligomerisierung des Proteins verantwortlich ist. Solche Protein E-Oligomere konnten durch Protein E-spezifische Antikörper auch nachgewiesen werden (Bläsi et al., 1989).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen lysierter Zellen zeigten nach PhiX174 Infektion keine Veränderung der Zellmorphologie (Markert und Zillig 1965); sie waren lediglich optisch leer. Ein extensiver Abbau von Murein konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Witte pers. Mitteilung). Zum Zeitpunkt der optisch sichtbaren Lyse wurde ein Abfall des Membranpotentials, Ausströmen von K^+ -Ionen ebenso wie die Freisetzung von cytoplasmatischen und geringfügig auch von periplasmatischen Enzymen beobachtet (Witte und Lubitz 1988).

Aufgrund einer Vielzahl von Daten wurde ein Modell der Protein E- Lyse aufgestellt. Dabei kommt es nach Integration von Protein E in die Cytoplasmamembran zu einer Oligomerisierung von mehreren Protein E-Molekülen, die möglicherweise an Adhäsionszonen der inneren und äußeren Membran erfolgt. Abhängig von geringfügigem, lokalem Abbau von Murein wird diese Oligomerisierungsstruktur dazu benutzt, die äußere und innere Membran zu durchdringen und eine tunnelähnliche Struktur auszubilden, deren Porengröße es erlaubt, intrazelluläre Phagen freizusetzen (Witte und Lubitz 1988).

5. Einfluß zellulärer Faktoren auf die Protein E-induzierte Lyse von E. coli

Der genaue Mechanismus, durch den Protein E die Zellyse auslöst, ist noch weitgehend ungeklärt. Die Lyse der infizierten Bakterien ist nicht nur abhängig vom Genotyp der infizierenden Phagen, sondern auch von Wirtsfunktionen.

Nach Phageninfektion oder nach Expression des klonierten Gen E wird der Zeitpunkt des Lyseeintritts und die Stärke der Lyserate durch die Wachstumsrate der Wirtszellen festgelegt (Lubitz et al., 1984a). Bei Zellen, die verzögertes Wachstum oder auch Wachstumsstillstand zeigen, ist die Protein E-induzierte Lyse verzögert oder völlig inhibiert. Die Lyse von E. coli nach PhiX174-Infektion kann durch Zugabe von Mg^{2+} (Gschwender und Hofschneider 1969) oder Saccharose (Markert und Zillig 1965) inhibiert werden.

Für die PhiX174-induzierte Lyse von E. coli zogen Markert und Zillig (1965) eine Inhibierung der Mureinbiosynthese oder die Induktion von bakterieneigenen autolytischen Enzymen in Betracht. Zelluläre Voraussetzungen, die für die künstliche Autolyse von E. coli durch EDTA gelten (Leduc und Heijenoort 1980), konnten auch für die Gen E Produkt-induzierte Lyse von E. coli aufgezeigt werden (Lubitz et al. 1984a). Beide Vorgänge sind abhängig vom pH-Wert des Außenmediums, dem

physiologischen Zustand der Zellen, der externen Ionenkonzentration und der Osmolarität des Mediums.

Untersuchungen an einer (ts)-Autolyse-defekten **lytA** Mutante von *E. coli* (Harkness und Ishiguro 1983) zeigten, daß die durch Penicillin-induzierte und Gen E Produkt-induzierte Lyse gemeinsame zelluläre Voraussetzungen benötigen (Lubitz et al., 1984b). Andererseits können *E. coli* Mutanten, die gegen EDTA- und Moenomycin-induzierte Lyse resistent sind (Leduc et al., 1984), durch Protein E normal lysiert werden (Halfmann et al., 1984). Es konnte daher nicht eindeutig geklärt werden, ob die Lyseinduktion für Protein E und Penicillin gleich ist, oder ob durch übergeordnete Kontrollmechanismen der Zelle voneinander unabhängige Prozesse ablaufen.

Notwendige zelluläre Voraussetzungen für die Protein E-induzierte Lyse von *E. coli* wurden durch Untersuchungen an Mutanten mit Veränderungen in der Lipidzusammensetzung (**fadR**), oder mit pleiotropen Defekten, die zu einer veränderten Zellmorphologie (**envC**) führen, dahingehend belegt, daß sowohl die Lipidkomposition, als auch Kontrollmechanismen, die eine regulierte Zellteilung erlauben, einen Einfluß auf die Lyse haben (Wadle et al., 1986).

6. Problemstellung

Zelluläre Voraussetzungen der Protein E-induzierten Lyse

- Die Einflüsse zellulärer Mutationen auf die Protein E-induzierte Lyse von *E. coli* sollten bestimmt werden und damit weitere Einblicke in die notwendigen zellulären Voraussetzungen erhalten werden.
- Das Wachstumsverhalten von *E. coli* **lytB** Mutanten, die Toleranz gegen die Wirkung von Penicillin bei 42°C aufweisen, wurde nach PhIX174 Phageninfektion und nach Expression von kloniertem Gen E untersucht.
- E. coli* **wec** Mutanten, die nach Ausfall einer übergeordneten Kontrollfunktion der Zellelongation bei 42°C eine erhöhte Zelldichte zeigen, wurden ebenfalls auf ihr Wachstumsverhalten nach Expression von kloniertem Gen E untersucht.
- Durch eine neue Isolierung und Charakterisierung von *E. coli* **pxl** (PhIX174 lysis) Mutanten, die nach Expression von Gen E nicht mehr lysieren, sollten mögliche weitere zelluläre Einflüsse auf die Regulation der Gen E Expression und/oder auf die Protein E-induzierte Lyse identifiziert werden.

Kartierung des **pxlA** Genlocus

- Durch genetische Charakterisierung sollte der Genlocus einer **pxl**-Mutation (**pxlA**) auf dem Chromosom von *E. coli* bestimmt werden. Dabei sollten Hinweise auf eine Zuordnung der betroffenen Gene und der Genprodukte erhalten werden.
- Durch F'-Komplementationsanalysen sollte untersucht werden, ob die mutierte **pxlA**-Sequenz dominant oder rezessiv über den Wildtyp ist.
- Zur Vereinfachung der genetischen Kartierung sollte durch Transposonmutagenese ein Stamm konstruiert werden, bei dem die Selektion auf **pxlA** durch Kopplung mit dem Tn10 Resistenzmarker erfolgte.

Mit Hilfe verschiedener Konstruktionen sollte **pxIA** auf *E. coli* Hfr-Stämme übertragen werden und durch Konjugation eine grobe Genlokalisierung von **pxIA** erfolgen. Durch anschließende P1-Transduktionsversuche sollte die genaue Lage der Mutation auf dem Chromosom festgelegt werden.

Molekularer Mechanismus der Resistenz von *E. coli* *pxIA* Mutanten

-Der Nachweis der Gen E Expression vom Plasmid in **pxIA** Mutanten sollte durch Komplementation der **PhiX174** Gen Eam3-Mutation durchgeführt werden.

-Der Einfluß der **pxIA** Mutation auf die Expression der überlappenden Gene D und E sollte durch Analyse der GenD/E spezifischen-mRNA und der Proteine D und E aufgezeigt werden. Zusätzlich sollten das GenD/E-spezifische Transkript und die Proteine D und E in *E. coli* **pxI**⁺-Zellen und **pxIA**-Mutanten quantifiziert werden.

Klonierung der *pxIA*-Sequenz

-Durch Klonierung der **pxI**⁺ Wildtyp- und der **pxIA**-Mutantensequenz in einer Cosmid-Genbank sollten die molekularen Veränderungen auf DNA-Ebene näher untersucht werden, die zur Resistenz gegen die Protein E-induzierte Lyse führen.

Einfluß der klonierten *pxIA*-Sequenz auf die Gen D-und Gen E-Expression

-Durch Expression der Gene D und E im zellulären Hintergrund der klonierten **pxIA**-Sequenz sollte der für die *E. coli* **pxIA** Mutante aufgezeigte Mechanismus für die Resistenz gegen Protein E-induzierte Lyse bestätigt werden.

Einfluß der Wachstumsphase auf die Gen D-und Gen E-Expression

-Die Analyse der GenD/E-spezifischen mRNA und der Proteine D und E im zellulären Hintergrund stationärer Zellkulturen sollte näheren Aufschluß über den Einfluß von Wirtsfunktionen auf die Gen E Expression in dieser Wachstumsphase geben.

Heterologe Expression von **PhiX174 Gen E in grampositiven Bakterien**

-Durch Expression von Gen E im heterologen System und dem zellulären Hintergrund grampositiver Bakterien sollte die Wirkung des Gen E-Produkts auf dieses Zellsystem getestet werden.

II. Material

1. Bakterien

1.1 E. coli K12

Stamm	Sex	Genotyp	Herkunft
CSH57	F	leuB6 proC purE trpE hisG argG ilvA metA thi-1 ara-14 lacY galK xyl-5 mtl-1 malA azi-6 rpsL tonA tsx xth supE44	Miller 1972
JF1130	F	leuB6 thi-1 proA his argE pyrE lacY galK xyl-5 mtl-1 ara-14 chlG rpsL lam ⁻ supE	CGSC
AA100	F	thr-1 leuB thi-1 hisG argH trp-1 rbsK mtl-1 xyl malA ara-13 gal6 lacY strA tonA lam ^r lam ⁻ supE44	CGSC 5398
PC0666	F'20	leu his arg metB mal xyl mtl lam tonA phx rpsL	Phabagen
PC1312	F'141	argG metB his leu mal lacY gal xyl mtl tonA phx lam strA recA1 supE	Pabagen
PC1318	F'126	argG metB his trp mal galK xyl mtl phx lam strA recA	Phabagen
PC1319	F'134	argG metB his leu mal lacY gal xyl mtl tonA phx lam strA recA supE	Phabagen
PC1328	F'133	argG metB his leu mal lacY gal xyl mtl tonA phx lam strA recA supE	Phabagen
PC1329	F'111	argG metB his leu mal lacY gal xyl lam strA recA supE	Phabagen

Stamm	Sex	Genotyp	Herkunft
PC1331	F'144	thi metE trpE purE proC leu lacZ xyl ara mtl tonA tsx gal phx azi strA recA supE	Phabagen
PC2231	F'150	argG metB his leu lacY gal xyl mal lam tonA phx rpsL recA supE	Phabagen
GMS724	F'500	aroD recA metB lacY galK man-4 rpsL tsx supE	CGSC 5505
JE5550	F'506	lacY tsx supE galK manA aroD gyrA recA rpsL mtl argE	CGSC 5750
KL704	F'129	leuB tonA lacY supE gal-6 lam ⁻ hisG recA arG rpsL malA xyl mtl metB	CGSC 4248
EM3003	F'32	thi-1 argH purF dsdA1 aroC mtl-2 xyl-7 malA lacY lacZ strA tonA tsx lam ⁻ supE	CGSC 4210
Calq1	F'	F'lacI ^{q1} lac ⁺ pro ⁺ del(lac-pro) thi cap ⁻ cya ⁻ strA recA	U.Rüther, Köln (Rüther et al., 1981)
AT2457	Hfr	thi glyA phx rel p.o.o. HfrH	CGSC 4507
AT978	Hfr	thi dapE rel phx ths p.o.o. KL16	CGSC 4544
KL227	Hfr	metB relA lam ⁻ spoT p.o.o. PO3 of HfrP4X	CGSC 4312
AB2134	Hfr	metA relA lam ^r spoT p.o.o. PO118	CGSC 5915
CA8396	Hfr	relA spoT del(cya) thi-1 lam ⁻ p.o.o. PO1 of HfrH	CGSC 6027
JF496	Hfr	ubiF nagB2 relA spoT bglR asnA rbs-4 metB p.o.o. PO19 of Hfr Reeves	CGSC 6057
AN66	Hfr	thi-1 leuB ubiD lacZ rpsL (P1 ⁺) supE p.o.o. PO13 of Hfr AB313	CGSC 6075

Stamm	Sex	Genotyp	Herkunft
AT2444	Hfr	thi-1 metE relA lam ⁻ spoT p.o.o. PO1 of HfrH	CGSC 4503
CSH61	Hfr	trpR thi p.o.o. HfrC	Miller, 1972
KL228	Hfr	thi-1 leuB gal lacY lam ⁻ supE p.o.o. PO13 of AB313	CGSC 4318
AN382	F ⁻	argE thi-1 uncB rpsL supE	CGSC
E110	F ⁻	thr-1 leuB proA hisG glmS argE thi-1 ara-14 lac1 galK xyl mtl-1 strA tsx lam ⁻ supE	CGSC 5392
AN719	F ⁻	entA pyrE uncB argH rpsL lam ⁻ supE	CGSC 6309
JF448	F ⁺	asnB-32 relA-1 spoT1 bgIR-13 ansA-31 rbs-4 thi-1 lam ⁻	CGSC 6055
JC10240	Hfr	thr ilv thi srl::Tn10 recA relA spoT rpsE lam ⁻	Laborsammlung
HB101	F ⁻	hsdS (r ⁻ m ⁻)recA ara pro-2 leuB lacY galK rpsL xyl-5 mtl-1 supE lam ⁻	Laborsammlung
K12ΔH1Δtrp	F ⁻	lacZam del(bio-uvrB) del(trp) (lambda Nam7 Nam53 cl ₈₅₇ HI)	R.Remaut,Gent
pop2135		endA thi hsd mal cl ₈₅₇ lambda pR malPQ	O.Ralbaud,Gent
VC44		thi lysA dapD lytB	E.E.Ishiguro, Victoria,Canada
OV2	F ⁻	ilv his leu trp(am) thy(deo) ara(am) lac125(am) galU(am) galE tsx tyrT del(supF(ts)A81)	Martinez-Salas, Madrid
OV-25	F ⁻	wie OV-2 met(ts) arg(ts) wee(am)	Martinez-Salas,Madrid
CQ25	F ⁻	ara leu Lac ^{iq} lacZ purE gal his argG rpsL mtl ilv met thi	R.Young,Texas
CQ3	F ⁻	wie CQ 25 slyD	R.Young,Texas
NK5012		thr leu thi T5 ^r Phl80 ^r su ⁺	Laborsammlung

1.2. E.coli C

Stamm	Sex	Genotyp	Herkunft
PC 1363	F	pheA	Phabagen, Utrecht
HF 4714	F	pro arg leu his thy thr su ⁺	Phabagen, Utrecht

Die angegebenen Stämme waren Geschenke der Phabagen Collection, Dept. of Microbiology, University of Utrecht, The Netherlands, der CSGC-Barbara Bachmann Collection E. coli Genetic Stock Center, Dept. of Human Genetics, New Haven, USA oder entsprechend der angegebenen Herkunft.

1.3. Staphylococcus carnosus

SA311 Götz, F.TU, München

1.4. Konstruierte Stämme

Stamm	Sex	Genotyp	Konstruktion
GH10	HfrC	thi trp pxA	CSH61(pUH123) pxA
GH11	HfrC	thi trp pxA	GH10(pUH123) gecurt
GH12	HfrC	thi trp pxA ::Tn10	GH11
GH13	F	leuB proC purE trpE his argG lva metA thi-1 ara lacY galK xyl mtl malA azi rpsL tonA tsx supE pxA zhc::Tn10	CSH57 x P1(GH12)
GH14	F	wie CSH57 recA srl::Tn10	CSH57 x P1(JC10240)
GH15	F	wie GH14 recA srl::del Tn10	GH14
GH16	F	wie GH15 recA srl::del(Tn10) pxA zhc::Tn10	GH15 x P1(GH13)
GH19	F	pheA pxA zhc::Tn10	PC1363 x P1(GH13)
GH20	HfrH	thi glyA relA phx pxA zhc::Tn10	AT2457 x P1(GH13)
GH21	HfrC	thi trp pxA zhc::Tn10	CSH61 x P1(GH13)
GH22	Hfr	thi dapE relA phx ths pxA zhc::Tn10 p.o.o. KL16	AT978 x P1(GH13)

Stamm	Sex	Genotyp	Konstruktion
GH23	Hfr	metB relA lam ⁻ spoT pxlA zhc::Tn10 p.o.o. P4X	KL227 x P1(GH13)
GH25	Hfr	thr leuB thi-1 lacZ lam ⁻ supE pxlA zhc::Tn10 p.o.o. PO12	AB312 x P1(GH13)
GH26	Hfr	thi-1 leuB gal lacY lam ⁻ supE pxlA zhc::Tn10 p.o.o. PO13 of AB313	KL228 x P1(GH13)
GH53	F ⁺	asnB relA spoT bglR thi-1 lam ^r pxlA zhc::Tn10	JF448 x P1(GH21)
GH55	F ⁺	relA spoT bglR thi-1 lam ^r pxlA zhc::Tn10	JF448 x P1(GH21)
GH56	F ⁺	relA spoT thi-1 lam ^r pxlA zhc::Tn10	JF 448 x P1(GH 21)

2. Bakteriophagen

Phagen	Genotyp	Herkunft
PhiX174	wt	Laborsammlung
PhiX174K9	E. coli K12-Wirtsmutante	Laborsammlung
PhiX174am3	Gen E am	Laborsammlung
P1	vir	Laborsammlung
lambda NK55	b221 cl857 Oam29 Tn10	Kleckner, N. 1978

3. Plasmide

Plasmide	relevante Marker	Herkunft
pUH12	P _{lac} -GenE, amp,	Henrich et al., 1982a
pUH123	P _{lac} -GenE, lacI ^q , amp, tet	Henrich et al., 1983b
pMC7	lacI ^q , tet	Laborsammlung
pSB12	P _L -GenE, amp	Bläsi et al., 1985a
pSB35	P _L -GenD/E, amp	Bläsi 1987
pSB85-1	lacZ, amp	Bläsi 1987
pSI-1	P _{spac} , lacI, cat	Henner et al., 1984
pBR322	tet, amp	Bolivar et al., 1977
pcl857	cl857, kan	Remaut et al. 1981
pRM17	P _L -GenE-L, amp	Harkness et al., 1987
pMS2	P _L -GenL, amp	Kastelein et al., 1983
pAW1	P _L -GenE, kan, PO15	Witte pers.comm.
pHC79	lambda cos, tet, amp	Hohn et al., 1980
pLC20-47	bgIB, ColE1	Neidhardt et al., 1983
pLC35-38	proT, ColE1	Neidhardt et al., 1983
pLC4-45	proT, ColE1	Neidhardt et al., 1983

4. Medien

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l dest. Wasser

R-Medium: 10 g Trypton, 1 g Hefeextrakt, 8 g NaCl, 2 ml CaCl₂ (1 M),
5 ml Glucose (20%), ad 1 l dest. Wasser; Stocklösungen von CaCl₂ und
Glucose wurden getrennt autoklaviert.

DMM-Medium: 1,5 g K₂HPO₄, 4,5 g KH₂PO₄, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0,3 g Trinatriumcitrat,
1ml MgSO₄ (1 M), 10 ml Glucose (20%) oder andere C-Quelle,
0,5 ml B1 (10mg/ml), ad 1 l dest. Wasser;
Stocklösungen wurden getrennt autoklaviert.

Lambda-Medium: 10 g Trypton, 2,5 g NaCl.

Lambda-YM-Medium: Lambda-Medium, 0,01% Hefeextrakt, 0,2% Maltose.

Dowell-Medium: 10 g Trypton, 2,5 g NaCl, 2,5 g KCl; ad 1 l dest. Wasser.

PH-Medium:	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 1 g Glucose, 1 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, ad 1 l dest. Wasser;
DM3-Medium:	1 M Natriumsuccinat pH 7,3 (500 ml), 5% Caseinhydrolysat (100 ml), 10% Hefeextrakt, (50 ml) 3,5 % K_2HPO_4 - 1,5% KH_2PO_4 (100 ml), 50% Glucose (10 ml), 1 M MgCl_2 (20 ml), 10 % BSA (10 ml), 200 ml dest. Wasser. Stocklösungen wurden getrennt autoklaviert .
4 x PAB:	6 g Trypton, 6 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 4 g Dextrose, 14 g NaCl, 5,3 g KH_2PO_4 , 14,8 g K_2HPO_4 : ad 1 l dest Wasser.
CY3-Medium:	10 g Casaminoacids, 10 g Hefeextrakt, 5,9 g NaCl; ad 400 ml dest. Wasser.
CY3-Weichagar-Mix:	CY3-Weichagar (25 ml), 1 M Natriumsuccinat pH 7,3 (25 ml), 1 M MgCl_2 (1 ml), 50% Glucose (0,5 ml), 1,5 M Glycerolphosphat (2 ml), 5% BSA (0,5 ml).
2 x SMM:	0,5 M Saccharose, 0,02 M Maleinsäure, 0,02 M MgCl_2 , pH 6,5.
SMMP:	8 Teile 2 x SMM, 2 Teile 4 x PAB, 0,5 Teile BSA.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde zum jeweiligen Medium 15 g Agar pro l dest. Wasser zugesetzt; für Top-Agar 8 g Agar pro l dest. Wasser. Je nach Resistenz der plasmidtragenden Stämme wurden die Antibiotika Ampicillin (100ug/ml); Tetracyclin (10 ug/ml); Kanamycin (50 ug/ml); Streptomycin (25 ug/ml); Chloramphenicol (10ug/ml) zugesetzt.

5. Puffer und Lösungen

TEE-Puffer x 50 :	2 M Tris-HCl, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,2.
TBE-Puffer x 10 :	0,89 M Tris-HCl, 0,89 M Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,3.
TE -Puffer x 1 :	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,02 mg/ml Ribonuklease, pH 8.
Laemmli-Reservoirpuffer :	25 mM Tris-HCl, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 6,8.
Sammelgelpuffer 4 x :	0,5 M Tris-HCL, 0,4% SDS, pH 6,8.
Trenngelpuffer 4 x :	1,5 M Tris-HCL, 0,4% SDS, pH 8,8.
Proteinprobenpuffer :	25 mM Tris-HCL, 20% Glycerin, 3% -Mercaptoethanol, 3% SDS, 0,05% Bromphenolblau, pH 8,2.
Transblotpuffer I :	0,3 M Tris/HCL, 20% Methanol, pH 10,4.
Transblotpuffer II :	0,025 M Tris/HCL, 20% Methanol, pH 10,4.
Transblotpuffer III :	0,04 M Amino-n-Caprinsäure, 0,025 M Tris-HCL, 20% Methanol pH 9,4.
PBS-A 10 x :	150 mM NaCl, 100 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2.

DNA-Probenpuffer 5 x :	50 mM Tris-HCl, 25% Saccharose, 0,1% SDS, 0,05% Bromphenolblau, pH 8,2.
RNA-Probenpuffer :	100% deionisiertes Formamid, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylenblau.
RNA-Puffer 2x :	80 mM Tris-HCl, 72 mM NaH ₂ PO ₄ , 4 mM EDTA, pH 7,0
Prähybridisierungspuffer:	50% Formamid, 1 M NaCl, 1% SDS.
Hybridisierungspuffer :	50 % Formamid, 1 M NaCl, 1% SDS, 300 ug/ml Herings-DNA.
Z-Puffer :	40 mM NaH ₂ PO ₄ , 60 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 50 mM Mercaptoethanol, pH 7,0.
Tris-SDS-Puffer :	100 mM Tris-HCl, 1% SDS, 100 mM NaCl , pH 9,0.
Saline-EDTA-Puffer :	150 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0.
Na-Acetat-Puffer :	50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 5,0.
NaCl-Puffer :	50 mM Tris-HCl, 100 mM Magnesiumsulfat, 1 mM DTE, 500 ug/ml BSA, pH 7,2.
Lysepuffer (Staphylococcen) :	50 mM Tris-HCl, 300 mM EDTA, 0,5% Brij, 0,04% Natriumdeoxycholat, pH 8,0.
Lysepuffer (E. coli) :	50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCL, pH 8,0.
SSC x 10 :	150 mM NaCl, 150 mM Natriumcitrat, pH 7,2.
SM-Puffer :	20 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO ₄ , pH 7,5.
Lambda-in-vitro-packing-Puffer:	10 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl ₂ , 0,01% Gelatine, pH 7,4.
Ligationspuffer 1 x :	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,8.
Nick-Translationspuffer 10 x :	500 mM Tris-HCl pH 7,2, 100 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE, 500 ug/ml BSA.
Linker-Kinase-Puffer 10 x :	700 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM MgCl ₂ , 50 mM DTE.
CIP-Puffer 10 x :	500 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ZnCl ₂ , 10 mM Spermidin.

6. Chemikalien

Radiochemikalien:

³⁵S-Methionin (1023Ci/mmol) : Amersham Buchler, Braunschweig

¹⁴C-Markerproteine: Carboanhydrase (30 kD),
Trypsininhibitor (21,5 kD),
Cytochrom C (12,5kD),
Aprotinin (6,5 kD),
Insulin (3,4 kD und 2,3kD),
Amersham Buchler, Braunschweig.

alpha-³²P-dATP (3000 Ci/mmol): Amersham Buchler, Braunschweig.

Enzyme:

DNA-Polymerase I, Polynukleotidkinase, T4-Ligase : Boehringer, Mannheim. Alle verwendeten **Restriktionsenzyme** wurden von folgenden Firmen bezogen : BRL, New England Biolabs, Boehringer Mannheim.

Plasmid pHC 79 : Boehringer, Mannheim

Lambda-in-vitro-packing kit: Amersham Buchler, Braunschweig.

Gene screen plus : NEN DuPont, Dreieich

Alle übrigen verwendeten Chemikalien und Reagenzien waren handelsüblichen Produkte der Firmen Serva, Merck, Fluka, Sigma, Difco und Boehringer.

III. Methoden

1. Mikrobiologische Methoden

1.1. Wachstums- und Lysetests

Einzelkolonien der verwendeten *E. coli* Stämme wurden über Nacht bei entsprechender Temperatur in Vollmedium oder DM-Medium angezogen. Wachstums- und Lysekurven wurden durch Messung der optischen Dichte bei O.D.₆₀₀ erstellt.

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl erfolgte bei steigender optischer Dichte durch Ausplattieren definierter Verdünnungen. Nach Inkubation über Nacht wurde die Kolonienzahl bestimmt.

1.2. Phagentiter und Phagenvermehrung

1.2.1. PhiX174

Die Phagentiterbestimmungen erfolgten nach der Overlay-Methode (Adams 1959), wobei eine Phagensuspension unbekannten Titors in 0,05 M Natriumtetraborat in definierten Schritten verdünnt wurde. Je 0,1 ml dieser Verdünnungen wurden mit 2,5 ml LB-Weichagar, versetzt mit CaCl₂ (Endkonzentration 10⁻³ M), und 0,2 ml Indikatorbakterien einer exponentiell gewachsenen *E. coli* PC1363-Kultur gemischt und auf LB-Agarplatten überschichtet. Nach 6-8 h Inkubation bei 37°C wurden die Plaques ausgezählt.

Zur Vermehrung von PhiX174 wt oder PhiX174am3 wurden Einzelplaques ausgestochen und eine in 100 ml Cawell-Medium gewachsene Kultur von *E. coli* C PC1363 bei O.D.₆₀₀ 0,05 infiziert. Nach 2-3 h Inkubation bei 37°C (der Verlauf der optischen Dichte wurde ständig kontrolliert) oder bei Eintritt der optisch sichtbaren Lyse wurde die Suspension bei 20 krpm in der Sorvall 20 min abzentrifugiert. PhiX174 wt infizierte Zellen wurden in 5 ml 0,05 M Dinatriumtetraborat resuspendiert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. PhiX174am3-infizierte Zellen wurden künstlich mit Lysozym/EDTA lysiert und anschließend ebenfalls in 5 ml 0,05 M Natriumtetraborat resuspendiert.

Titerbestimmungen ergaben einen Phagentiter von ungefähr 10⁹ pfu/ml.

Um höhere Phagentiter zu erreichen, wurden 8 l Vollmedium einer exponentiellen *E. coli* C PC1363 Kultur nach Zugabe von 1 mM CaCl₂ (Endkonzentration) bei einer O.D.₆₀₀ von 0,8 mit PhiX174wt m.o.l. von 0,01 infiziert. Nach 3 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (Sorvall SS10, 8 krpm, 4°C, 10 min). Zur Freisetzung der nach PhiX174am3 Infektion intrazellulär gebildeten Phagen wurde das Zellpellet in 20 ml 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 10 mg/ml Lysozym resuspendiert, 30 min auf Eis, 10 min bei 37°C belassen und durch 3maliges Einfrieren und Auftauen die Zellen aufgeschlossen. Nach Abtrennen der Zelltrümmer (SS34, 20 krpm, 4°C, 3 min) wurden die Phagen durch Ultrazentrifugation (SW 27, 27 krpm, 4°C, 2 h) sedimentiert und in 1 ml 0,05 M Dinatriumtetraborat resuspendiert.

Das Zellsediment, das die PhiX174wt Phagen enthielt, wurde zunächst in 200 ml 50 mM Dinatriumtetraborat resuspendiert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Zur Freisetzung der PhiX174wt Phagen wurde die Suspension mit 10 ml Lysozymlösung (2 mg/ml in 10 mM Tris pH 8,0) für 5 min und anschließend mit 5 ml 100 mM EDTA, pH 8,0 für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden in drei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten entfernt: (1.: Sorvall SS8, 20 min, 8 krpm; 2.: Sorvall SS34, 20 min, 15 krpm; 3.: Beckman SW27, 30 min, 8 krpm). Die Sedimentation der Phagen erfolgte durch Ultrazentrifugation des Überstandes (SW27, 4 h, 27 krpm, 4°C). Das Phagenpellet wurde in 2 ml 50 mM Dinatriumtetraborat aufgenommen und der Phagentiter ermittelt. Für diese Präparationsansätze wurde der Phagentiter mit ungefähr 10^{12} - 10^{13} pfu/ml bestimmt.

1.2.2. P1

Die Titerbestimmung erfolgte nach der Overlay-Methode auf R-Agar-Platten, wobei 0,2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* CSH61 mit 0,1 ml P1vir-Phagensuspension verschiedener Verdünnungsstufen gemischt, zur Adsorption 20 min bei Raumtemperatur belassen und nach Zugabe von 3 ml R-Weichagar auf R-Agar-Platten überschichtet wurden.

Zur Herstellung eines Lysats von P1vir wurden 0,2 ml einer exponentiell gewachsenen *E. coli* Kultur mit P1vir m.o.i. 0,1 infiziert, zur Adsorption 20 min bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 3 ml R-Weichagar auf R-Agarplatten überschichtet. Nach konfluenter Lyse der Zellen wurde der Weichagar von den Platten abgekratzt, in sterile Zentrifugenröhrchen überführt, gut gemischt, mit 100 µl Chloroform versetzt, 30 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend (Sorvall SS34, 4°C, 40 min, 20 krpm) zentrifugiert. Die Phagen im Überstand wurden austitriert.

1.2.3. Lambda NK55

Zur Bestimmung des Phagentiters wurde *E. coli* NK5012 in Lambda-YM-Medium bis zur O.D.₆₀₀ 0,5-0,6 angezogen. Je 0,2 ml dieser Kultur wurden mit 3 ml Lambda-Weichagar und 0,1 ml verschiedener Verdünnungsstufen von Lambda NK55 gemischt und nach Adsorption auf Lambda-Agarplatten gegossen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C. Zur Herstellung eines frischen Plattenlysats wurden 0,2 ml *E. coli* NK5012 und 0,2 ml Phagenlysat von NK55 (5×10^6 pfu/ml) mit 3 ml Lambda-Weichagar gemischt, auf Lambda-Agarplatten gegossen, 4-7 h bei 42°C inkubiert, mit 3 ml Lambda-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Der Puffer wurde in sterile Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen abzentrifugiert (Sorvall SS34, 10krpm, 30min, 4°C) und der Phagentiter im Überstand bestimmt.

2. Genetische Methoden

2.1. Transposonmutagenese mit Tn10 und Eliminierung von Tn10

E. coli Rezipientenstämme für die Transposonmutagenese wurden in Lambda-Medium bis zu einer Zelldichte von 5×10^8 - 10^9 cfu/ml angezogen, abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 10 krpm, 4°C , 10 min) und das Pellet in 1/20 des Ausgangsvolumens in Lambda-Maltose-Medium resuspendiert. Nach Infektion der Zellen mit Lambda NK55 m.o.l. 5 wurde die Suspension zur Adsorption der Phagen für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden in 30 ml Lambda-Maltose-Medium gewaschen und zur Expression der Tetracyclin-Resistenz 2 h bei 30°C Zellen inkubiert. Durch Zentrifugation (Sorvall SS34, 10 krpm, 4°C , 20 min) wurden die Zellen konzentriert und das Pellet in 3 ml Medium resuspendiert. Je 0,1 ml der Suspension wurden auf Selektivplatten mit Tetracyclin (10 $\mu\text{g/ml}$) und 2,5 mM Natriumpyrophosphat ausplattiert und bei 30°C 24-48 h bebrütet. Die Transposition von Tn10 erfolgte mit einer Frequenz von 10^{-3} .

Um den spontanen Verlust von Tn10-Insertionen zu ermöglichen, wurden Tn10-tragende Klone über einen Zeitraum von 3 Tagen in Abwesenheit von Tet bei 37°C angezogen und dabei mehrfach in frisches LB-Medium überimpft. Zur weiteren Anreicherung Tet^s-Klone wurden die Bakterien in LB-Medium mit 12 $\mu\text{g/ml}$ Fusarsäure und 0,1 mM ZnCl_2 überimpft und auf LB-Platten mit und ohne Tet (10 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert.

2.2. Transduktion

Transduktionsexperimente wurden nach der Methode von Miller (Miller 1972) mit P1vir durchgeführt.

2.3. Konjugation

Hfr-Kreuzungsversuche wurden nach einer modifizierten Methode nach Miller (Miller 1972) durchgeführt.

2.4. F'-Faktor-Kreuzungen

F'-Faktor-Kreuzungen wurden durchgeführt, indem 9,9 ml einer in Davis-Minimalmedium exponentiell gewachsenen E. coli Kultur des Rezipienten mit 0,1 ml des Donors gemischt und für 90 min ohne Schütteln bei 30°C inkubiert wurden. Je 0,1 ml der Suspension wurden auf DMM-Selektivplatten ausplattiert und bei 30°C und 42°C inkubiert.

2.5. Test genetischer Marker

pxIA	die Selektion auf pxIA erfolgte durch Transformation von Mutanten mit Lyseplasmiden, die konstitutiv Gen E exprimieren.
livA	Wachstum auf DMM mit/ohne <i>Isoleucin</i>
xyl	Wachstum auf DMM mit <i>Xylose</i> als einziger C-Quelle
mtl	Wachstum auf DMM mit <i>Mannitol</i> als einziger C-Quelle
cya	Wachstum auf DMM mit <i>Xylose</i> als einziger C-Quelle
uncB	Wachstum auf DMM mit <i>Succinat</i> als einziger C-Quelle
ubiB	Wachstum auf DMM mit <i>Succinat</i> als einziger C-Quelle
rbsK	Wachstum auf DMM mit <i>Ribose</i> als einziger C-Quelle
asnA	Wachstum auf DMM mit/ohne <i>Asparagin</i>
bgIR	Wachstum auf DMM mit <i>Salicin</i> als einziger C-Quelle bgIR -Mutanten können aromatische- β -Glucoside wie <i>Salicin</i> und <i>Arbutin</i> als C-Quelle verwerten. Wildtypzellen bgIR ⁺ können diese Substrate nicht als C-Quelle nutzen.
metB	Wachstum auf DMM mit/ohne <i>Methionin</i> .

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. Transformation

3.1.1. Transformation von E.coli

Die Präparation kompetenter E. coli Zellen und Transformation wurden nach einer modifizierten Methode von Dagert (Dagert et al.1979) durchgeführt.

Zur Transformation wurden zu 200 μ l kompetenter Zellen ungefähr 100 pg Plasmid DNA gegeben, die Zellen 10 min auf Eis belassen und anschließend 0,8 ml LB-Medium zugegeben. Nach Expression der Antibiotikaresistenz durch 1 h Schütteln bei 28°C oder 37°C wurden die Zellen auf Selektivplatten ausplattiert und für 10-12 h inkubiert.

3.1.2. Transformation von Staphylococcus carnosus

3.1.2.1. Protoplastenbildung

300 ml PH-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von Staphylococcus carnosus SA311 beimpft, 6 h bei 37°C geschüttelt und die Zellen in sterilen Nalgene-Röhrchen abzentrifugiert (SS34, 10 krpm, 10 min, 4°C). Nach Resuspension des Zellpellets in 20 ml SMMP-Medium und Überführung in einen 100 ml Erlenmeyerkolben erfolgte durch Zugabe von 20 μ l Lysostaphin (Stocklösung 1 mg/ml) die Protoplastierung für 1-2 h. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation geerntet (SS34, 10 krpm, 30 min, 4°C) und das Sediment in 2 ml SMMP-Medium aufgenommen.

3.1.2.2. Protoplastentransformation

0,3 ml der präparierten Protoplasten wurden mit 30 μ l Plasmid DNA (ungefähr 1 μ g), 2 ml 40% PEG und 7 ml SMMP sanft gemischt, im Ausschwingrotor zentrifugiert (Haereus, 4 krpm, 20 min, 20°C), das Pellet in 1 ml SMMP vorsichtig resuspendiert und je 100 μ l auf DM3-Platten ausplattiert. Nach 3 h Regenerationszeit bei 37°C wurden die Platten mit 3 ml CY-3 Weichagar, versetzt mit Chloramphenicol (10 μ g/ml), überschichtet und für 24 h weiterinkubiert.

3.2. Präparation von DNA

3.2.1. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.2.1.1. Minilysate

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte nach der von Maniatis (Maniatis et al. 1982) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse.

3.2.1.2. Reinigung von Plasmid-DNA über CsCl-Gradienten

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden plasmidtragende Stämme in 1 l Vollmedium mit entsprechendem Antibiotikum bis O.D.₆₀₀ 0,8 angezogen und zur Amplifikation der Plasmide nach Zugabe von 200 μ g/ml Chloramphenicol 10-12 h weiterinkubiert.

Die Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse (Maniatis et al. 1982) und anschließender Fällung der Plasmid-DNA mit dem 0,6fachen Volumen Isopropanol. Das getrocknete Pellet wurde in 40 ml TE-Puffer aufgenommen. Pro ml Puffer wurden je 1 g CsCl und 300 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt und in Quick-seal-Röhrchen (Beckman) eingeschweißt. Nach Zentrifugation (Beckman Ti70, 40 krpm, 17°C, 42 h) wurde die Plasmidbande gezapft.

Durch 3malige Extraktion mit Isobutanol (gesättigt mit TE-Puffer) wurde das Ethidiumbromid entfernt, die DNA mit 96% Ethanol gefällt, durch Zentrifugation pelletiert, getrocknet und in 10 mM TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der O.D.₂₆₀ bestimmt.

3.2.2. Präparation von Φ X174 RF-DNA

E. coli C PC1363 wurde in 1 l Vollmedium angezogen und bei O.D.₆₀₀ 0,8 mit Φ X174 m.o.i. 5 infiziert. Zur Hemmung der Proteinsynthese wurden 10 min nach Infektion 200 μ g/ml Chloramphenicol zugesetzt und die Kultur 1 h weiterinkubiert. Durch Zentrifugation (Sorvall, SS10, 8 krpm, 4°C) wurden die Zellen geerntet und das Pellet in 50 ml 5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5 resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml Lysozym/EDTA (15 mg/ml EDTA pH 7,5), 30 min Inkubation bei 37°C und mehrmaliges Einfrieren und Auftauen künstlich lysiert. Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (SS34, 20 krpm, 4°C, 30 min) geerntet, die DNA mit 10% PEG 6000 gefällt, abzentrifugiert (SS34, 13 krpm, 40 min, 4°C), getrocknet und das Pellet in 40 ml 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8,0 gelöst. Die Reinigung der so präparierten Phagen-DNA erfolgte über Gleichgewichtszentrifugation im Cäsiumchloridgradienten.

3.2.3. Isolierung von chromosomaler DNA aus *E. coli*

Chromosomale DNA aus *E. coli* wurde nach einer modifizierten Methode von Marmur (Marmur 1961) isoliert.

1,5 l einer über Nacht in Vollmedium gewachsenen *E. coli* Kultur wurden abzentrifugiert (Sorvall SS10, 20 min, 8 krpm, 4°C) und das Pellet bei -70°C schockgefroren. Nach dem Auftauen wurde das Pellet langsam in 6 ml Saline/EDTA-Puffer (20 mg/ml Lysozym, 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 50 ml Tris-SDS-Puffer (100 mM Tris/HCl, 1% SDS, 100 mM NaCl, pH 9,0) und anschließender Proteinextraktion mit einem gleichen Volumen an Phenol (equilibriert in Tris-SDS-Puffer). Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (Haereus, 6 krpm, 20 min, 4°C) wurde der Überstand mit einer weitlumigen Pipette abgehoben und mit 2fachem Volumen 96%igem Ethanol gefällt.

Um hochmolekulare chromosomale DNA zu erhalten, wurde die gefällte DNA auf einen Glasstab gewickelt und in 20 ml 1x SSC-Puffer (0,15 M NaCl, 0,15 M Natriumcitrat) resuspendiert. Nach 20 min RNase-Behandlung (50 µg/ml) wurde die DNA 2x mit Phenol/Chloroform und anschließend bis zur vollständigen Klärung des Überstandes 6x mit Chloroform extrahiert.

Die Reinheit der isolierten chromosomalen DNA wurde durch Messung des Adsorptionsspektrums im Bereich zwischen 230-320 nm festgestellt. Die Konzentrationsbestimmung der präparierten DNA erfolgte durch die Formel $O.D._{260}/20 = \text{mg DNA/ml}$.

3.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Staphylococcus carnosus*

30 ml einer Übermalkkultur einer in PH-Medium angewachsenen plasmidhaltigen *Staphylococcus carnosus* SA311 Kultur wurden abzentrifugiert (SS34, 10 krpm, 4°C, 10 min) und das Pellet in 1 ml NaCl-Puffer (0,05 M Tris-HCl, 2,5 M NaCl, 0,05 M EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysostaphin (Stammlösung 1 mg/ml in Tris-Acetat-Puffer pH 4,0), 100 µl RNase (1 mg/ml in Wasser) und anschließender Inkubation bei 37°C für 15 min wurde 1 ml Lysepuffer (0,05 M Tris-HCl, 0,3 M EDTA, 0,5% Brij 56, 0,04% Natriumdeoxycholat pH 8,0) zugesetzt, 30 min auf Eis belassen und abzentrifugiert (SS34, 18 krpm, 30 min, 4°C). Die DNA wurde mit Polyethylenglycol (PEG) gefällt, wobei zu je 1,6 ml Lysat 0,4 ml einer 50% PEG 6000 Lösung gegeben und diese für 2 h bei 4°C inkubiert wurden. Nach 15 min Zentrifugation bei 15000g wurde das Sediment in 0,4 ml 10 mM TE-Puffer aufgenommen und zum Ausfällen der Proteine 240 µl 5 M Natriumperchlorat zugesetzt. Die Suspension wurde mit 1,6 ml Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, ausgeschüttelt und bei 15000g abzentrifugiert. Die DNA wurde mit dem 0,6fachen Volumen Isopropanol gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die so gereinigte DNA konnte mit Restriktionsenzymen verdaut werden.

3.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus E. coli

10 ml einer exponentiell gewachsenen E. coli Kultur wurden bei einer O.D.₆₀₀ von 0,8 durch Zentrifugation bei 15000g konzentriert, das Pellet in 0,4 ml Natriumacetat/EDTA-Puffer pH 5,0 resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Zugabe von 40 µl 10% SDS (5 min, 0°C). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe gleichen Volumens an Phenol und heftigem Schütteln im 65°C Wasserbad extrahiert. Nach Schockgefrieren bei -70°C wurden die Phasen durch Zentrifugation (15000g, 4°C, 5 min) getrennt und die RNA 1x mit Phenol/Chloroform und 2x mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Die mit dem doppelten Volumen an 96%igem Ethanol gefällte RNA konnte nach Zugabe des RNase-Inhibitors DEP bei -20°C mehrere Monate aufbewahrt werden. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der isolierten RNA wurden spektroskopisch bestimmt.

3.4. Enzymreaktionen mit DNA

3.4.1. Verdau durch Restriktionsenzyme

Für die Restriktionsansätze wurde den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller gefolgt.

3.4.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte im kleinen Reaktionsvolumen (20 µl) in 1x Ligationspuffer, wobei das molare Verhältnis von Vektor-DNA zur zu inserierenden Fragment-DNA 1:5 betrug. Zur Ligation von überstehenden Enden wurden 0,03 Einheiten T4 DNA-Ligase, für glatte Enden 1 U T4-Ligase pro µl Reaktionsvolumen verwendet. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 12°C.

3.4.3. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

5' überstehende Phosphatreste bei DNA-Fragmenten wurden durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase beseitigt. Die präparierte Vektor-DNA wurde im kleinen Reaktionsvolumen mit 10x CIP-Puffer und 1 U alkalischer Phosphatase 30 min bei 37°C inkubiert, danach mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und mit 2fachem Volumen 96% Ethanol gefällt, getrocknet und in 10 mM TE-Puffer gelöst.

3.4.4. Phosphorylierung von synthetischen Linkern

5'OH-Enden von synthetischen Linkern wurden mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Die Reaktion wurde in Gegenwart von 10x Linkerkinasepuffer mit 0,3 nM synthetischen Linkern und 8 U Polynukleotidkinase für 1 h bei 37°C in 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt.

3.4.5. Nick-Translation

DNA-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese isoliert und gelelektrophoretisch (Biotrap Schleicher & Schüll) oder über BND-Cellulose gereinigt. Ungefähr 0,2-0,4 µg DNA wurden im Reaktionsvolumen von 50 µl 3 h bei 18°C mit 10x Nick-Translationspuffer, je 10 µM dCTP, dGTP,

dTTP, 10 uCi (alpha-³²P-) dATP ca. 3000 Ci/mmol) und 2 Einheiten Polymerase I inkubiert. Durch Zugabe von 5 ul tRNA (10 ug/ml) und 3fachem Volumen 96%igem Ethanol wurde die DNA gefällt und für 30 min bei 15000g in der Eppendorfsentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der radioaktive Einbau wurde im Szintillationszähler gemessen.

3.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden ungefähr 20 ug DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, der Reaktionsansatz mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein präparatives Agarosegel mit einem Taschenvolumen von 50-150 ul aufgetragen. Nach dem Gellauf (80 V, 1,5 h) wurde das Gel in Ethidiumbromid (2 ug/ml) gefärbt und die identifizierte Gelbande ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gelstück elektrophoretisch (Biotrap Schleicher & Schüll) eluiert und der DNA-Gehalt über ein analytisches Gel durch Vergleich zu DNA bekannter Konzentration bestimmt.

3.6. Anlegen einer Genbank mit chromosomaler DNA von E.coli

3.6.1. Präparation von 30-45 kb DNA-Fragmenten aus chromosomaler E.coli-DNA

500 ug chromosomale E. coli-DNA wurden partiell mit Sau3A 1 h bei 37°C verdaut, wobei die Enzymkonzentration so gewählt wurde, daß Fragmente in der Größenordnung zwischen 30-45 kb entstanden (die entsprechende Enzymkonzentration wurde in einem Vorversuch bestimmt). Die Fragmentgrößen wurden mit einem Aliquot des Ansatzes auf einem analytischen Agarosegel bestimmt. Der gesamte Restriktionsansatz wurde anschließend über einen 25%-40% Saccharosegradienten (SW27, 20 krpm, 4°C, 20 h) zentrifugiert. Je 0,5 ml Fraktionen des Gradienten wurden abgezapft und die DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese in einem 0,4% Gel bestimmt. Die Fraktionen, die DNA-Fragmente in der Größenordnung zwischen 30-45 kb enthielten wurden vereinigt, die DNA mit Ethanol (96%) gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und in TE-Puffer bis zu einer Endkonzentration von 300-500 ug/ml gelöst.

3.6.2 Ligation chromosomaler DNA-Fragmente mit dem Cosmidvektor pHc79 und Lambda *in vitro* Verpackung

Die Cosmidvektor-DNA pHc79 wurde im 10fachen Überschuß zur zu inserierenden genomischen DNA eingesetzt. Nach der Ligationsreaktion bei 14°C über Nacht wurde gelelektrophoretisch die Vollständigkeit der Ligationsreaktion überprüft. Die Verpackung der ligierten DNA in Lambda erfolgte über einen Lambda In-Vitro-Packing-Kit (Amersham) nach Angaben des Herstellers. Zur effizienten Verpackung hochmolekularer DNA betrug die totale DNA Konzentration im Ligationsansatz ungefähr 225 ug/ml.

3.6.3 Titration der Cosmid-Genbank

E. coli HB101 wurde in 25 ml Vollmedium, versetzt mit 4% Maltose, bei 37°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden geerntet (SS34, 4 krpm, 20 min, 4°C) und das Pellet in 12,5 ml 10 mM MgCl₂ resuspendiert. 100 µl Phagensuspension (aus der Lambda-in-vitro-Verpackung 3.6.2.) wurden mit 200 µl Zellen vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1,2 ml Vollmedium zugegeben und die Suspension für 1 h bei 37°C geschüttelt. Je 100 µl des Ansatzes wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (25 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

4. Gelelektrophoresen

4.1. DNA-Gelelektrophorese

4.1.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA in analytischen Gelen wurden je nach Fragmentgrößen Agarosekonzentrationen zwischen 0,4%-2% gewählt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 1-2 h. Nach Färbung mit Ethidiumbromid (2 µg/ml in Wasser) konnten durch Vergleich mit DNA-Größenstandards die DNA-Fragmentgrößen der zu analysierenden DNA bestimmt werden.

4.1.2. PAA-Gele

Zur Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (kleiner als 400 bp) wurden 6% PAA-Gele (6% Acrylamid, 0,16% Bisacrylamid, 0,05% TEMED, 1% APS in TBE-Puffer) verwendet. Die DNA-Proben wurden in Vertikalgelapparaturen bei 150 V für 1,5 h in 1x TBE-Puffer elektrophoretisiert und mit Ethidiumbromid gefärbt.

4.2. Proteingelelektrophorese

SDS-PAGE von Proteinen wurde in einer vertikalen Flachgelapparatur (Studier 1973) nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Durch Färbung mit Coomassie (0,3% Coomassie-blau, 45% Methanol, 10% Essigsäure) und anschließender Entfärbung mit einem 45% Methanol/10% Essigsäure-Gemisch erfolgte die Sichtbarmachung der Proteinbanden.

5. Radioaktive Markierung von Proteinen

Zur radioaktiven Markierung des Gesamtproteins von *E. coli* wurden Zellen bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,5 in Davis-Minimalmedium angezogen, 100 µl der Kultur entnommen und mit 10 µCi (1023 Ci/mmol) ³⁵S-Methionin markiert. Nach 20 min Inkubation wurden die Proteine mit 1,0 Volumen 10% eiskalter TCA gefällt, 1/2 min abzentrifugiert, das Pellet in 20 µl 1x Laemmli-Probenpuffer 10 min gekocht und die Proteine auf einem 15%-20% SDS-PA-Gradientengel aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die Banden mit 45% Methanol/10% Essigsäure-Gemisch fixiert, das Gel unter Vakuum getrocknet und ein Autoradiogramm mit Kodak RP-X Omat Röntgenfilm hergestellt.

6. Immunoblot (Western-Analyse)

Nach Auftrennung von Gesamtzellproteinen aus *E. coli* im SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrocellulosefilter (Porengröße 0,1 μm) übertragen (Towbin et al., 1979, Burnette 1981).

Der Elektrottransfer erfolgte in einer Trockenblotapparatur mit Graphitplatten. Dazu wurden sechs Lagen Filterpapier mit Puffer I (0,3 M Tris-HCl, 20% Methanol, pH 10,4) getränkt, auf die Anodenplatte gelegt. Auf drei weitere mit Puffer II (0,025 M Tris-HCl, 20% Methanol, pH 10,4) getränkte Lagen Filterpapier wurde die mit destilliertem Wasser abgespülte Nitrocellulose-Membran aufgelegt. Hierauf wurde das SDS-PAGE-Gel luftblasenfrei gelegt. Auf das Gel kamen drei weitere Lagen Filterpapier, die mit Puffer III (0,04 M Amino-n-Caprinsäure, 0,025 M Tris, 20% Methanol, pH 9,4) getränkt waren. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte wurde das Gel 1,5 h bei 260 mA auf die Nitrocellulosemembran geblottet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und Unterdrückung des Bandenhintergrunds wurde nach dem Blotten die Nitrocellulosemembran 2x für 15 min bei 37°C mit je 75 ml 0,05% Tween 20 in 1x PBS-A inkubiert. Zum Verdünnen der Antikörper (1:100-1:500) wurde ebenfalls 1x PBS-A verwendet. Der Nitrocellulosefilter wurde 3 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde 3x mit je 50 ml 0,05% Tween 20 in PBS-A gewaschen, der biotinylierte Anti-Kaninchen-Antikörper (Verdünnung 1:625) in PBS-A und 1% BSA zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde wiederum 3x für jeweils 5 min mit 0,05% Tween 20 in PBS-A gewaschen und der Streptavidin-Peroxidase Komplex (Hsu et al. 1981) in einer Verdünnung von 1:400 in PBS-A und 1% BSA für 30 min mit dem Filter inkubiert und wiederum 3x für 5 min mit 0,05% Tween 20 in PBS-A gewaschen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wurde der Nitrocellulosefilter mit einem chromogenen Substrat für konjugierte Peroxidase inkubiert. Die Substratlösung bestand aus 20 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol (gelöst in 0,5 ml Ethanol) in 50 ml 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5, der 0,93% Wasserstoffperoxid enthielt.

7. DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Analyse)

DNA-DNA-Hybridisierungsexperimente nach Southern (1975) wurden durchgeführt, indem Gesamt- oder Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau und Auftrennung im Agarosegel 30 min in 0,4 N NaOH, 0,6 M NaCl denaturiert und anschließend zur Neutralisation 30 min bei RT in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 geschüttelt wurden. Die DNA wurde über Nacht mit 10x SSC Puffer (1,5 M NaCl, 0,15 M NaCitrat) auf Gene-Screen-Plus Membranfilter (DuPont) geblottet. Nach dem Blotten wurden die Membranfilter in Plastikbeutel eingeschweißt und 15 min in Prähybridisierungslösung (50% deionisiertes Formamid, 1% SDS, 1 M NaCl) bei 42°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte durch Zugabe von (α -³²P)-dATP-markierten DNA-Proben über Nacht in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 1% SDS, 1 M NaCl, 300 $\mu\text{g/ml}$ Herings-DNA) bei 42°C. Der Filter wurde 2x für 5 min mit 2x SSC bei RT, 2x für 30 min in 2x SSC, 1% SDS bei 65°C und 2x für 30 min mit 0,1x SSC bei RT gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte mit einem Kodak RP-X-Omat-Röntgenfilm.

8. RNA-DNA-Hybridisierung (Northern-Analyse)

Unter denaturierenden Bedingungen wurden im Agarose-Harnstoffgel (6 M Harnstoff, 1,6% Agarose in 1x RNA-Puffer) 10 µg E. coli Gesamt-RNA aufgetrennt. Über Nacht wurde die RNA durch Diffusion mit 10x SSC auf Gene-Screen-Plus Membranfilter (DuPont) gebロットet. Nach der Prähybridisierung für 15 min in Prähybridisierungslösung (50% Formamid, 1% SDS, 1M NaCl, 300µg/ml Herings-DNA) erfolgte die Hybridisierung gegen eine (alpha-³²P)-dATP-markierte DNA unter gleichen Versuchsbedingungen wie die DNA-DNA-Hybridisierung.

9. Koloniehybridisierung

E. coli Transformanten wurden mit Zahnstochern auf eine LB-Platte übertragen und über Nacht inkubiert. Die Kolonien wurden auf "Colony Screen-Filter" (DuPont) übertragen, der Filter anschließend 2x für 2 min in 0,5 N NaOH und 2x für 2 min in 1 M Tris-HCl pH 7,5 inkubiert.

Nach dem Trocknen erfolgte die Hybridisierung gegen (alpha-³²P) markierte DNA bei 42°C in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 1% SDS, 1 M NaCl, 300 µg/ml Herings-DNA). Der Filter wurde 2x 5 min mit 2x SSC bei RT, 2x 30 min in 2x SSC, 1% SDS bei 65°C und 2x 30 min mit 0,1x SSC bei RT gewaschen. Die Autoradiographie wurde mit Kodak RP-X-Omat-Röntgenfilm durchgeführt.

10. Aufschluß von Zellen durch Lysozym /EDTA

Zum quantitativen Aufschluß wurden die Zellen durch Lysozym /EDTA Behandlung lysiert (Ron et al., 1966). Das Pellet der abzentrifugierten Kultur wurde in einem 1/5 des Ausgangsvolumens mit 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,1 gewaschen, in 1/10 Volumen des gleichen Puffers resuspendiert, 1/100 Volumen EDTA (8 mg/ml in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,1) zugesetzt und 20 min auf Eis gestellt. Dann wurde 1/100 Volumen Lysozymlösung (2 mg/ml in 0,025 M Tris pH 8,1) zugegeben und wieder 20 min auf Eis gekühlt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch 3x Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand weiter behandelt.

11. Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die β-Galaktosidaseaktivität wurde nach der Methode von Miller (Miller 1972) bestimmt.

12. Induktion von Autolyse

12.1. EDTA-Schock

1-2% einer E. coli Übernachtskultur wurden in 40 ml K-Medium angeimpft und bis O.D.₆₀₀ 0,4 angezogen. Die Kultur wurde abzentrifugiert (Sorvall, SS34, 10 min, 8 krpm), der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei RT in 20 ml 10⁻³M EDTA pH 6,5 aufgenommen, die O.D.₆₀₀ (bei t = 0 min) gemessen und in einem 200 ml Erlenmeyerkolben ohne Schütteln bei 37°C weiter inkubiert. Der

Verlauf der O.D.₆₀₀ wurde über einen Zeitraum von 1 h verfolgt.

12.2. Induktion von Autolyse mit Moenomycin

Die Autolyse wurde in einer exponentiell wachsenden *E. coli* Kultur bei O.D.₆₀₀ von 0,2 durch Zugabe von 20 µg/ml Moenomycin induziert und der Verlauf der optischen Dichte in 5 min Abständen kontrolliert.

13. Computerprogramme

Die Sekundärstruktur von selektierten mRNA-Längen wurde nach thermodynamischen Regeln nach Tinoco et al. (1973) und Lang und Burger (1986) mit dem Computerprogramm RNASE und Microgenie (Beckman) auf einem IBM-PC durchgeführt. Homologievergleichs-Analysen erfolgten mit dem Programm Microgenie von Beckman.

IV. Ergebnisse

A. Einfluß zellulärer Mutationen auf die Protein E-Induzierte Lyse von *E. coli*

1. Untersuchungen an der temperatursensitiven- β -Lactam-toleranten *lytB* Mutante von *E. coli*

Untersuchungen an der temperatursensitiven (ts) Autolyse-defekten *E. coli* Mutante VC30 (*lytA*) zeigten, daß die durch Penicillin-Induzierte und die Gen E Produkt-Induzierte Lyse von *E. coli* gemeinsame zelluläre Voraussetzungen benötigen (Lubitz et al., 1984b). *E. coli* VC30 weist bei der restriktiven Temperatur von 42°C sowohl nach Behandlung mit Penicillin oder D-Cycloserin, Entzug von Diaminopimelinsäure (DAP) im Medium sowie der endogenen Wirkung des Gen E Produkts einen lysenegativen Phänotyp auf. Aufgrund des lysenegativen Phänotyps von *E. coli* VC30 nach Behandlung mit Penicillin oder Protein E unter restriktiven Bedingungen konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob der Mechanismus der Autolyse und der Gen E Produkt-Induzierten Lyse von *E. coli* gleich ist, oder ob gemeinsame regulatorische Funktionen der Autolysekaskade, deren Funktion noch nicht bekannt ist, einen voneinander unabhängigen Mechanismus auslösen. Die letztgenannte Möglichkeit scheint zutreffender, da die Behandlung mit D-Cycloserin oder DAP-Entzug von *E. coli* VC30 bei restriktiver Temperatur ebenso toleriert wird, wie der Einfluß von Penicillin oder endogen von Protein E.

Um den Zusammenhang zwischen Autolyse-induzierenden Agenzien und endogener Induktion von Lyse durch Protein E weiter zu untersuchen, wurden Versuche an der (ts)- β -Lactam-toleranten Mutante VC44 (*lytB*) durchgeführt. Diese Mutante zeigt nur gegen β -Lactam Antibiotika wie Benzylpenicillin Toleranz bei restriktiver Temperatur von 42°C, jedoch nicht gegen D-Cycloserin und DAP-Entzug (Shimmin et al., 1984).

1.1. Effekt von PhiX174 K9-Infektion auf das Wachstum von *E. coli* VC44 bei 30°C und 42°C

Kulturen der (ts)- β -Lactam-toleranten *E. coli* VC44 *lytB* Mutante lysierten nach PhiX174 K9-Infektion 30 min nach Infektion bei nicht-restriktiver Temperatur von 30°C (Fig. 2A). Bei 42°C war das Wachstum von *E. coli* VC44 nach 30 min reduziert; Toleranz gegen Penicillin wurde ungefähr 30 min nach Wachstum bei dieser Temperatur ausgedrückt (Fig. 2B).

Infektion mit PhiX174 K9 30 min nach Erhöhung der Temperatur auf 42°C führte zur Lyse der Kultur, wobei ein Abfall der optischen Dichte um etwa 25% beobachtet werden konnte.

Der Lyseeintritt und die Lyserate von PhiX174 K9-infizierten Kulturen ist abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und der Wachstumsphase der Wirtszellen (Lubitz et al., 1984a). Rate und Ausmaß der Lyse von PhiX174 K9-infizierten VC44-Kulturen bei 42°C waren im Vergleich zur Lyserate der bei 30°C verbliebenen Kultur reduziert. Die Reduktion der Lyserate der bei 42°C infizierten Zellen konnte auf einer teilweisen Toleranz der Kultur gegen PhiX174-induzierte Lyse oder auch auf einer ungenügenden Expression von Gen E Produkt beruhen.

Die Penicillintoleranz bei *E. coli* VC44 wurde erst 30 min nach Temperaturerhöhung exprimiert. Es war daher möglich, daß Teile der infizierten Kultur die Toleranz gegen die Phagen-induzierte Lyse in dieser Zeit noch nicht ausgeprägt hatten.

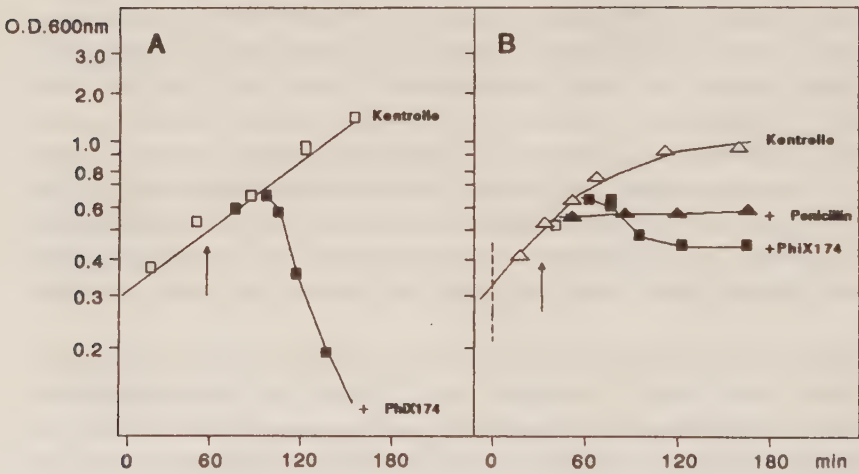


Fig. 2 Einfluß der PhiX174 K9-Infektion und Behandlung mit Benzylpenicillin auf *E. coli* VC44

A. Eine bei 30°C exponentiell wachsende *E. coli* VC44-Kultur wurde zum angegebenen Zeitpunkt (Pfeil) mit PhiX174 K9 m.o.i. 2 infiziert. Der Wachstumsverlauf der unbehandelten ($\square$) und der PhiX174-infizierten Kultur ($\blacksquare$) wurden photometrisch bei O.D. 600 verfolgt.

B. Die Inkubationstemperatur einer exponentiell bei 30°C wachsenden Kultur von *E. coli* VC44 wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ min (unterbrochene Linie) von 30°C auf 42°C erhöht. 30 min nach Temperaturerhöhung (Pfeil) wurde ein Teil der Kultur mit PhiX174 K9 m.o.i. 2 infiziert ($\blacksquare$) oder mit Benzylpenicillin (500 µg/ml) behandelt ($\blacktriangle$). Das Wachstum wurde photometrisch verfolgt. Die Kontrolle ($\triangle$) gibt das Wachstum von *E. coli* VC44 bei 42°C wieder.

Verlängertes Wachstum: von *E. coli* VC44 bei 42°C vor PhiX174 K9-Infektion auf 40 min oder darüber hinaus auf 50 und 60 min führte zur vollständigen Inhibierung der Lyse und damit zur Ausprägung der Toleranz gegen PhiX174 K9-induzierte Lyse (Fig.3).

Alle folgenden Versuche zum Einfluß der *lytB* Mutation auf die PhiX174 induzierte Lyse wurden daher nach einer Vorinkubationszeit von 45 min bei 42°C durchgeführt.

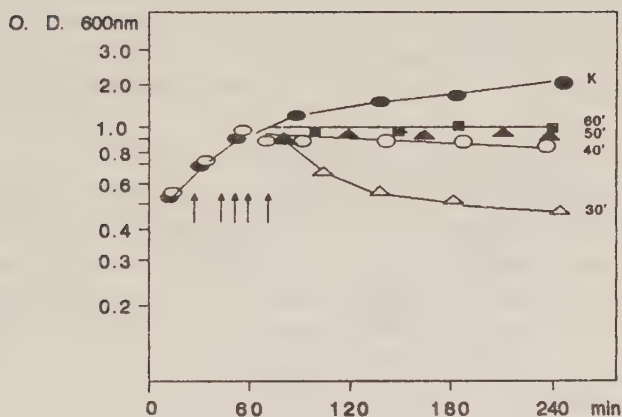


Fig. 3 Effekt der PhiX174 K9-Infektion auf *E. coli* VC44 nach verlängertem Wachstum bei 42°C.

Die Inkubationstemperatur einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* VC44 wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ min von 30°C auf 42°C erhöht. Nach Temperaturerhöhung wurden einzelne Proben zu verschiedenen Zeitpunkten $t = 30$ (Δ), 40 (○), 50 (▲) und 60 (□) min mit PhiX174 K9 m.o.i. 2 infiziert (Pfeile) und der Kurvenverlauf photometrisch bei O.D.600 bestimmt. Die Kontrolle (●) gibt das Wachstum von VC44 bei 42°C wieder.

Ob die verzögerte Lyse-Toleranz nach Phageninfektion aufgrund einer ungenügenden Hitze-Inaktivierung eines notwendigen Faktors oder durch zusätzliche unspezifische Faktoren erfolgt war, wurde weiter untersucht.

1.2. Effekt von Chloramphenicol und Kanamycin auf *E. coli* VC44 nach PhiX174 K9-Infektion bei 30°C und 42°C

Toleranz gegen die Penicillin-induzierte Lyse von *E. coli* VC44 ist reversibel, wenn die Temperatur von 42°C auf 30°C wieder herabgesetzt wird. Für diesen Prozeß ist keine Proteinsynthese notwendig, da die Zellyse auch in Gegenwart von Chloramphenicol und Kanamycin kurz nach Temperaturherabsetzung erfolgt (Shimmin et al., 1984). Durch Zugabe von Inhibitoren der Proteinsynthese nach Rückkehr zur permissiven Temperatur von PhiX174 K9-infizierten *E. coli* VC44-Kulturen sollte untersucht werden, inwieweit die Phagen-induzierte Lyse ebenfalls von einem proteinsyntheseaktiven Prozeß abhängig ist.

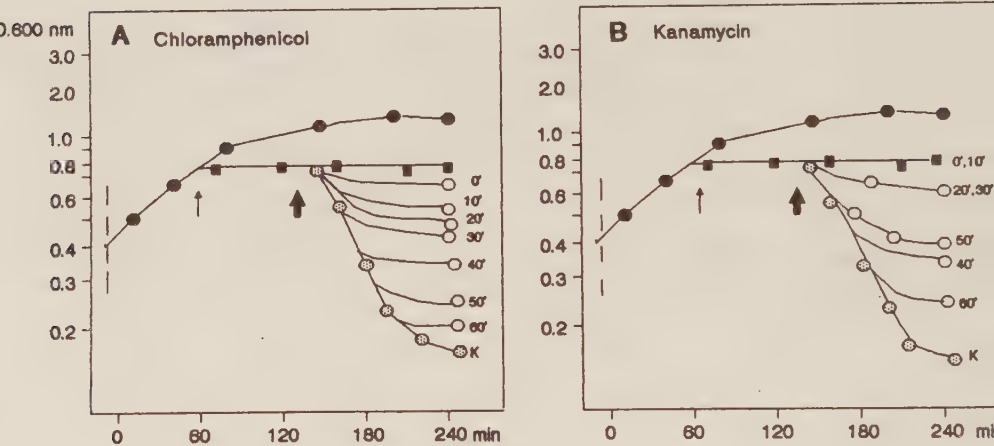


Fig. 4 Effekt von Chloramphenicol (A) und Kanamycin (B) auf die Lyserate PhiX174 K9-infizierter *E. coli* VC44-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Rückkehr zur permissiven Temperatur

Die Inkubationstemperatur einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* VC44 wurde von 30°C auf 42°C erhöht (gestrichelte Linie).

A. 45 Minuten nach Wachstum bei 42°C wurde *E. coli* VC44 (●) mit PhiX174 K9 m.o.i. 2 infiziert (dünner Pfeil). Nach 1,5 h bei 42°C wurde die Temperatur auf 30°C (dicker Pfeil) erniedrigt. Zu verschiedenen Zeitpunkten $t = 0, 10, 20, 30, 40, 50$, und 60 min nach Temperaturemniedrigung (dicker Pfeil) wurden einzelne Proben mit Chloramphenicol (200 µg/ml) (○) behandelt; ein Teil wurde bei 42°C weiterinkubiert (■). Die Kontrolle K gibt das Lyseverhalten von *E. coli* VC44 ohne Zugabe von Chloramphenicol wieder. Der Verlauf des Wachstums wurde photometrisch bei O.D. 600 bestimmt.

B. Versuchsanordnung wie unter A. Anstelle von Chloramphenicol wurde Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt.

E. coli VC44-Kulturen, die Toleranz nach PhiX174-Infektion bei 42°C ausgeprägt hatten, lysierten nach Temperaturniedrigung in Gegenwart von Chloramphenicol nicht (Fig. 4 A). Wurde kein Proteinsynthesehemmer zugegeben, lysierten die Zellen 30 min nach Wechsel von 42°C auf 30°C. In Abhängigkeit zur zeitlichen Zugabe von Chloramphenicol lysierten die Zellen leicht (0 min) oder teilweise (20-30 min), wobei die Lyse jeweils kurz nach Antibiotikazugabe inhibiert wurde. Die optische Dichte blieb anschließend über mehrere Stunden konstant.

Im Gegensatz zur Penicillin-induzierten Lyse konnte die Lyse Phagen-infizierter VC44-Zellen durch Zugabe von Chloramphenicol zu jedem Zeitpunkt nach Eintritt der optisch sichtbaren Lyse verhindert werden; für diesen Prozeß war somit Proteinsynthese notwendig. Gleichzeitig war das Ausmaß der Lyse abhängig von der Inkubationszeit bei 30°C vor Zugabe des Proteinsyntheseinhibitors.

Inhibierung der Proteinsynthese durch Kanamycin (Fig. 4B) nach Temperaturherabsetzung von 42°C auf 30°C führte entweder zur vollständigen Inhibierung (0-10 min) oder zu einer Reduktion der Lyse (20-30 min). Lyse zeigten nur solche Kulturen, bei denen die Antibiotikazugabe 40, 50 und 60 min nach Temperaturherabsetzung erfolgt war.

Für die *E. coli* Mutante VC30 (*lytA*), die bei 42°C gegen die Gen E Produkt-induzierte Lyse tolerant ist, wurde gezeigt, daß sowohl nach PhiX174-Infektion als auch nach Expression des klonierten Gen E Produkts die Lyse nach Herabsetzen der Temperatur von 42°C auf 30°C auch in Gegenwart von Chloramphenicol sofort eintritt (Lubitz et al., 1984b) und damit keine Proteinsynthese für diesen Prozeß notwendig ist. Die Lyse PhiX174K9-infizierter *E. coli* VC44 (*lytB*) ist jedoch nach Rückkehr zur permissiven Temperatur abhängig von der Synthese eines zellulären Proteins.

Untersuchungen mit PhiX174 in Gegenwart von Inhibitoren der Transkription und Translation haben gezeigt, daß für die Lyse von *E. coli* nach Infektion die Bildung von reifen Phagen benötigt wird. Zugabe von Chloramphenicol zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion bis zur Mitte der Latenzperiode, jedoch nicht später, verhindert die Lyse infizierten Zellen (Markert et al., 1965). Die Lysehemmung von PhiX174 K9-infizierten VC44-Zellen nach Zugabe von Proteinsyntheseinhibitoren beruht daher möglicherweise auf der Inaktivierung einer für die Phagenentwicklung essentiellen Wirtsfunktion im frühen Replikationsstadium. Falls durch die Assoziation eines unspezifischen Effekts mit *lytB* die Phagenentwicklung gestört war, sollte keine intrazelluläre Akkumulation von Phagen erfolgen.

1.3. Phagenentwicklung von PhiX174 K9 in infizierten E. coli VC44 Zellen bei restriktiver Temperatur

Die Bestimmung der intrazellulären Phagenentwicklung von PhiX174 K9 nach Infektion von VC44 bei restriktiver Temperatur von 42°C (Tab.1) zeigte, daß die Phagenentwicklung entweder sehr langsam oder nur in einem Teil der infizierten Zellen stattgefunden hatte, da während der Versuchsdauer von 2 h weniger als 10 reife Phagen pro Zelle gebildet wurden.

Daraus wurde geschlossen, daß aufgrund eines unspezifischen Effekts auf die Phagenentwicklung Gen E Produkt bei der restriktiven Temperatur nur sehr schwach exprimiert wurde und damit keine Lyse von VC44 erfolgen konnte.

Bei restriktiver Temperatur war in E. coli VC44 die Bildung von Phagenpartikeln derart gestört, daß erst nach Rückkehr zur permissiven Temperatur eine erneute Phagenreplikation erfolgte. Dabei konnte die Phagenentwicklung durch Inhibierung der Proteinsynthese im frühen Replikationsstadium jedoch jederzeit gestört werden, wodurch nur die Teile der Kultur lysierten, in denen genügend Phagen gebildet worden waren. Die Beeinflussung der PhiX174-Replikation in E. coli VC44 ist damit unabhängig von der *lytB* Mutation, die auch in Gegenwart von Chloramphenicol und Kanamycin reversibel ist.

Tab.1 Akkumulation von reifen Phagenpartikeln in E. coli VC44 nach Infektion mit PhiX174 K9

Zeitpunkt nach Infektion t(min)	Phagentiter nach künstlicher Lyse pfu/ml x 10 ⁷
0	0,1
20	1,0
40	4,5
60	8,0
120	9,0

E. coli VC44 wurde in exponentieller Wachstumsphase mit PhiX174 K9 (m.o.i. 2) 45 min nach Erhöhung auf die restriktive Temperatur von 42°C infiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurden je 1 ml Proben entnommen, die Zellen künstlich mit Lysozym/EDTA lysiert und der intrazelluläre Phagentiter bestimmt. 10⁷ pfu/ml zum Zeitpunkt t = 0 min entsprechen unter diesen Bedingungen den reversibel adsorbierten Phagen.

1.4. Effekt von NaCl auf die phänotypische Toleranz von *E. coli* VC44 nach Infektion mit PhiX174 K9

Die *lytB* Mutation, die Penicillin-Toleranz in *E. coli* VC44 hervorruft, kann durch verschiedene chaotrope und antichaotrope Agenzien wie NaCl supprimiert werden (Shimmin et al., 1984). Eine der möglichen Erklärungen für diesen Effekt wäre eine erhöhte Perturbation der Membran, die eine Aktivierung des autolytischen Systems in *lytB* Mutanten bewirkt. Die durch NaCl erhöhte Sensitivität von *E. coli* VC44 für die Wirkung von Penicillin bei 42°C könnte eine by-pass Funktion sein, die der *lytB* Mutation entgegenwirkt (Shimmin et al., 1984).

Da die frühen Stadien des PhiX174 Replikationszyklus membrangebunden sind (Denhardt und Sinsheimer 1965), sollte untersucht werden, ob die Phagenreplikation und die anschließende Phagenfreisetzung nach der Zugabe von NaCl unter restriktiven Bedingungen wieder möglich ist (Fig. 5).

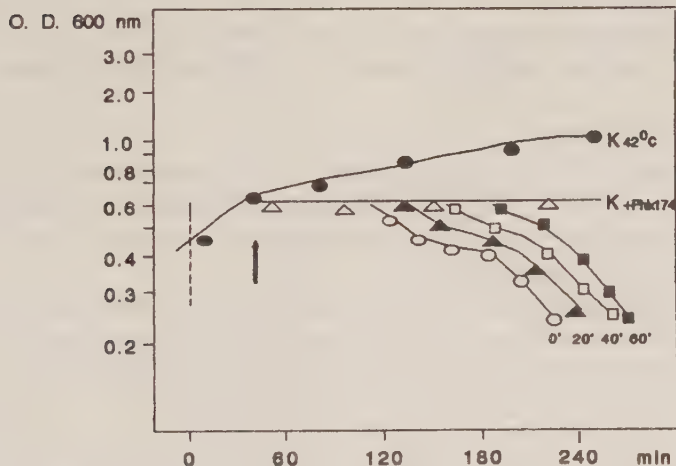


Fig.5 Effekt von NaCl auf *E. coli* VC44 nach PhiX174 K9-Infektion bei 42°C

Die Inkubationstemperatur einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* VC44 wurde von 30°C auf 42°C erhöht (unterbrochene Linie). 45 min nach Temperaturerhöhung auf 42°C wurde ein Teil der Kultur (△) mit PhiX174 K9 m.o.i. 2 (Pfeil) infiziert. Die infizierte Kultur wurde geteilt und zu den Zeitpunkten $t = 0$ (○), 20 (▲), 40 (□) und 60 min (■) nach Infektion wurde 0,4 M NaCl (Endkonzentration) zugegeben. Als Kontrolle (●) diente eine unbehandelte VC44 Kultur bei 42°C. Der Verlauf des Wachstums wurde photometrisch bei O.D. 600 verfolgt.

Der Defekt des Wirtsbakteriums VC44, der bei der restriktiven Temperatur die Phagenreplikation inhibierte, konnte durch NaCl bei Zugabe zum Zeitpunkt der Phageninfektion supprimiert werden, und die Kultur lysierte ungefähr 60 min nach Infektion. Ebenso war es möglich, die Phagenfreisetzung wieder herzustellen, wenn NaCl 20, 40 und 60 min nach Infektion zugegeben wurde, wobei der Lyseeintritt jeweils 20 min nach NaCl-Zugabe erfolgte. Die Lyseraten dieser Proben waren vergleichbar mit den Proben, bei denen Phageninfektion und NaCl-Zugabe gleichzeitig erfolgt waren.

In Gegenwart von NaCl wurde der unspezifische Effekt von *E. coli* VC44 auf die Phagenreplikation supprimiert und die Zellen lysierten normal.

1.5. Lyse von *E. coli* VC44 nach Expression des klonierten PhiX174 Gen E

Da aufgrund der Einwirkung eines unspezifischen Effekts auf die Replikation von PhiX174 in *E. coli* VC44 keine Aussage über den direkten Einfluß der *lytB* Mutation auf die Protein E-induzierte Lyse erfolgen konnte, wurde in den folgenden Versuchen Gen E vom Plasmid pUH123 (Fig. 6a) exprimiert. Die Wirkung von Protein E auf das Wachstum von *E. coli* VC44 sollte damit unabhängig von der Phagenreplikation untersucht werden.

30 min nach Zugabe des Induktors lysierte die Kultur, die bei 30°C verblieben war (Fig. 6b A.). Zellen, die 45 min bei 42°C vorinkubiert worden waren, lysierten 15 min nach Zugabe des Lactoseanaloges (Fig. 6b B.).

Im Gegensatz zu PhiX174 K9-infizierten Zellen war die Lyse von *E. coli* VC44(pUH123) unter restriktiven Bedingungen nicht inhibiert und erfolgte mit gleicher Rate und ebenso vollständig wie in der Kontrolle bei 30°C. Versuche, bei denen die Wachstumsperiode von VC44(pUH123) bei 42°C auf 60 min vor Zugabe von IPTG erhöht wurde, zeigten keinen anderen Effekt auf die Lyse der Kultur und waren mit der in Fig. 6b B. gezeigten Rate vergleichbar.

Der nach Induktion der Gen E-Expression wesentlich frühere Lyseeintritt von VC44(pUH123) bei 42°C verglichen mit der bei 30°C belassenen Kultur zeigte, daß weder die transkriptionalen noch translationalen Prozesse bei erhöhter Temperatur inhibiert waren. Vielmehr war die Expression von Gen E bei 42°C noch verstärkt, da die Lyse schon 15 min nach Induktion eintrat.

Auch hatte das reduzierte Wachstum von *E. coli* VC44(pUH123) bei 42°C keinen Einfluß auf die Lyse selbst. Dies steht im Gegensatz zu bisher gemachten Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, daß die Lyse von aktivem Wachstum und von der Wachstumsrate der Zellen abhängig ist. Ursachen dafür konnten entweder eine derart starke Schädigung der Zellen sein, so daß durch ein induzierendes Agens wie Protein E die Lyse ausgelöst wurde oder daß eine zusätzliche Mutation von *lytB* Mutanten die Wirkung von Protein E verstärkte.



Fig. 6a Vereinfachte Darstellung des Plasmids pUH123

Das Plasmid ist als Linie dargestellt. Gen E steht auf dem Plasmid pUH123 unter der transkriptionellen Kontrolle von P_{lac} . Neben amp und tet wird zusätzlich der $lacI$ -Repressor exprimiert.

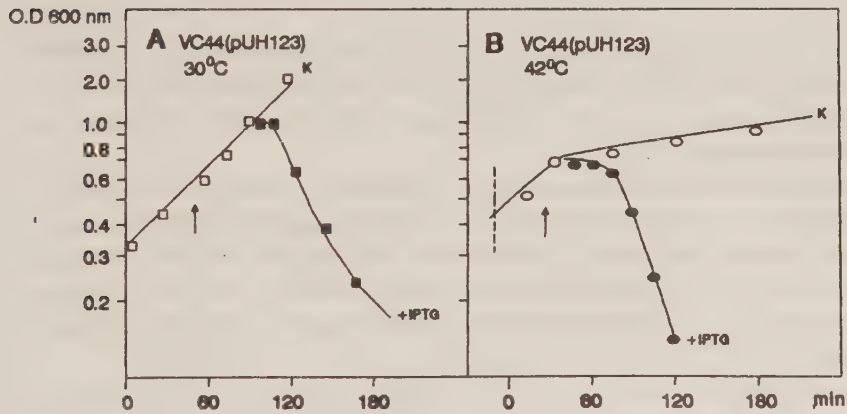


Fig. 6b Expression des klonierten PhiX174 Gen E vom Plasmid pUH123 in *E. coli* VC44

A. Zu einer exponentiell bei 30°C wachsenden *E. coli* VC44(pUH123)-Kultur wurde zum angegebenen Zeitpunkt (Pfeil) durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 5 mM) die Gen E Expression in einem Teil der Kultur (■) induziert. Als Kontrolle (□) diente die unbehandelte Kultur. Der Wachstumsverlauf wurde photometrisch bei O.D.-600 bestimmt.

B. Die Inkubationstemperatur einer exponentiell wachsenden Kultur von VC44(pUH123) wurde von 30°C auf 42°C erhöht (unterbrochene Linie). 45 Minuten nach Temperaturerhöhung wurde in einem Teil der Kultur (●) die Gen E Expression durch Zugabe von IPTG (Pfeil) induziert. Als Kontrolle (○) diente die unbehandelte Kultur bei 42°C. Der Wachstumsverlauf wurde photometrisch bestimmt.

Die **lytB** Mutation, die zur phänotypischen Toleranz gegen die Penicillin-induzierte Autolyse führt, betrifft somit keine essentielle Funktion der Protein E-induzierten Lyse von *E. coli*.

Der Einfluß auf die Replikation von Φ IX174 K9 nach Wachstum von *E. coli* VC44 bei 42°C war deshalb entweder ein Sekundäreffekt der Mutation oder die Konsequenz einer zusätzlichen Mutation von *E. coli* VC44, die bisher noch nicht beschrieben wurde.

Obwohl eine Reihe von gemeinsamen Faktoren für die Penicillin- und Protein E-induzierte Lyse von *E. coli* beschrieben wurden (Lubitz et al., 1984 a,b), lassen die an der *E. coli lytB* Mutante VC44 durchgeführten Untersuchungen den Schluß zu, daß die Art der Lyseinduktion nicht gleich ist, sondern daß vielmehr beide Vorgänge gemeinsamen, übergeordneten regulatorischen Funktionen der Zelle unterliegen.

Ob zelluläre Funktionen, die die Teilung und Elongation von *E. coli* steuern, Voraussetzung für die Protein E-induzierte Lyse sind, sollte durch Expression von Gen E in *E. coli wee* festgestellt werden.

2. Expression von Φ IX174 Gen E in der *E. coli wee* Mutante

Die Koordination von Zellwachstum, Zellängenzunahme und Zellteilung führt zu einem ausbalancierten Wachstum von *E. coli*, wobei die Zelllänge und das Alter der Zellen stark korreliert sind (Cullem und Vicente 1978). Veränderungen des Wachstumszustandes der Zellen verursachen eine Verschiebung dieses Gleichgewichtsprozesses.

Das Zellwachstum reguliert die DNA-Replikation durch Kontrolle der Zellmasse und der Initiation der Replikation (Donachie 1968). Die Synthesewege der Replikation, Elongation und Teilung sind jedoch voneinander unabhängig (Donachie et al., 1976). Zu einem späten Zeitpunkt während des bakteriellen Lebenszykluses sind die Wege für Replikation und Teilung möglicherweise koordiniert (Jones und Donachie 1973, Tormo et al., 1980). Eine Schädigung der DNA-Replikation beeinträchtigt gleichzeitig die Zellteilung.

Die Zellelongation scheint im Gegensatz zur Zellteilung auch in Abwesenheit der DNA-Replikation fortzuschreiten (Begg und Donachie 1978, Tormo et al., 1980, Tormo et al., 1985). Elongation und Teilung werden ebenfalls koordiniert. Zellen, die einen Ausfall des **wee** Genprodukts zeigen, sind kürzer und teilen sich bei einer Zelllänge, die unabhängig von ihrer Wachstumsrate ist, obwohl sie weiterhin zu Längenwachstum fähig sind (Martinez-Salas und Vicente 1980). Es wurde daher postuliert, daß das **wee** Genprodukt (Wee) einen Teil eines Mechanismus bildet, der die Elongation und die Teilung koordiniert (De la Campa et al., 1984); der Einfluß von Wee scheint jedoch unabhängig von der DNA-Replikation zu sein.

Die **wee** Mutante von *E. coli* OV-25 trägt eine am-Mutation im **wee** Gen, die durch einen temperatursensitiven Suppressor im zellulären Hintergrund unterdrückt wird. Bei restriktiver

Temperatur von 42°C kommt es damit zum Ausfall des *wee* Genprodukts. Dies führt zu einer Akkumulation der Zellmasse und des DNA-Gehalts, die Zelllänge und das Zellvolumen sind im Gegensatz dazu geringer als erwartet (Martinez-Salas und Vicente 1980). Die genetische Analyse von *wee* ergab eine dichte Nachbarschaft zu *cya* und *ilvA* und lokalisierte *wee* bei der min 83 auf dem *E. coli* Chromosom (Martinez-Salas und Vicente 1983)

Es war daher interessant zu sehen, ob die Protein E-Induzierte Lyse abhängig ist von der Anwesenheit des *wee* Genprodukts.

Der Einfluß des *wee* Genprodukts auf die Gen E Produkt induzierte Lyse von *E. coli* wurde durch Expression von Gen E vom Plasmid pUH123 in der *wee* Mutante OV-25 bei nicht-restriktiver Temperatur von 30°C und restriktiver Temperatur von 42°C untersucht (Fig.7).

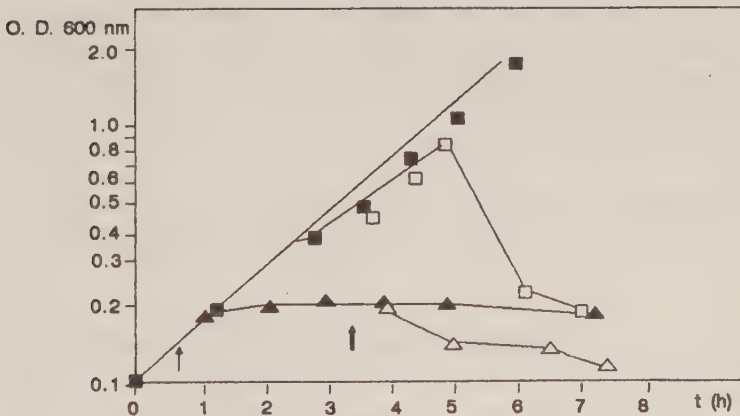


Fig.7 Wachstumsverhalten von *E. coli* OV-25 *wee* Mutanten nach Induktion der Gen E-Expression vom Plasmid pUH123

E. coli OV-25(pUH123) wurden bis zu einer O.D.₆₀₀ 0.2 bei 30°C in Vollmedium angezogen. In Proben der Kultur (▲) wurde zur Inaktivierung der *supF(ts)* die Temperatur auf 42°C erhöht (dünner Pfeil). 45 min nach Ausprägung der *wee* Mutation wurde in einem Teil der bei 42°C wachsenden Kultur die Gen E-Expression durch Zugabe von 5 mM IPTG (dicker Pfeil) induziert (△). Zu einem Teil der bei 30°C verbliebenen Kultur wurde IPTG (5 mM Endkonzentration) zugegeben (□) und ein Teil als Kontrolle (■) weiterwachsen gelassen. Der Wachstumsverlauf wurde photometrisch verfolgt.

In Anwesenheit von Wee teilten sich *E. coli* OV25-Zellen bei 30°C mit einer Generationszeit von 60 min. Nach Induktion der Gen E Expression vom Plasmid pUH123 lysierten die Zellen nach etwa 3 h. Für die Gen E Produkt-induzierte Lyse von *E. coli* wurde gezeigt, daß der Zeitpunkt des Lyseeintritts und die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in Vollmedium sehr stark korreliert und viele *E. coli* Stämme eine Generationszeit nach Induktion von Gen E lysieren (Halfmann 1983). Bei *E. coli* OV-25 war der Lyseeintritt auch in Anwesenheit von Wee sehr stark verzögert. Nach Eintritt der Lyse erfolgte die Abnahme der optischen Dichte sehr rasch. Bei Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C und Ausfall des **wee** Genprodukts stellten die Zellen das Wachstum nach einer Zellteilungsphase ein. Wurde in solchen Zellen Gen E vom Plasmid exprimiert, so erfolgte leichte Lyse 1,5 h nach Induktion. Die Lyserate war jedoch geringer als in Zellen, in denen Protein E in Anwesenheit von Wee exprimiert wurde.

Die Reduktion der Lyserate bei restriktiver Temperatur von 42°C war möglicherweise auf die reduzierte Wachstumsrate der Zellen zurückzuführen.

Temperatursensitive- β -Lactam-tolerante Mutanten, die Wachstumsstillstand bei Ausfall des **lytB** Genprodukts zeigen, können ebenso wie **wee** Mutanten von *E. coli* durch Protein E lysiert werden. Damit kann festgestellt werden, daß weder die **lytB** Genfunktion noch das **wee** Genprodukt zu den notwendigen zellulären Voraussetzungen der Gen E Produkt-induzierten Lyse von *E. coli* zählen.

B. Isolierung und genetische Charakterisierung von *pxlA* Mutanten von *E. coli*

Die bisher durchgeführten Ansätze zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der Protein E-Induzierten Lyse von *E. coli* hatten gezeigt, daß weder die *lytB* noch die *wee* Genfunktion zu den notwendigen zellulären Voraussetzungen gehören.

Durch Isolierung und Charakterisierung von resistenten *E. coli* Mutanten, die nach Expression von Gen E nicht mehr lysieren, sollte es möglich sein, zelluläre Einflüsse auf die Regulation der Gen E Expression und /oder auf die Protein E-Induzierte Lyse zu bestimmen. Damit kann eine bessere Einsicht in die molekularen Zusammenhänge der Regulation (transkriptional/ translational/ post-translational) erhalten werden.

Durch kontrollierte Expression von kloniertem Gen E kann die Protein E-Induzierte Lyse von *E. coli* unabhängig von sonstigen Einflüssen des Phagensystem untersucht werden.

Bei den zur Isolierung von Protein E-resistenten *E. coli* Mutanten verwendeten Plasmiden stand Gen E entweder unter Kontrolle der *lac po* (P_{lac})-Region (Plasmide pUH12 und pUH123; Henrich et al., 1983b) oder dem linksseitigen Promotor von Lambda (P_L) (Plasmid pSB12; Bläsi et al., 1985a) (Fig.8). Gen E-Expression, die von Lambda P_L erfolgt, kann über den thermosensitiven *cl₈₅₇*-Repressor (defekter Lambda-Phage auf dem Chromosom oder Plasmid *pcl₈₅₇*) reguliert werden. Bei dem Plasmid pUH123 erfolgt die Repression durch das auf dem Plasmid vorhandene *lacI^q* Gen. Jeder *E. coli* Stamm kann mit diesem Plasmid transformiert und die Lyse der Zellen durch Zugabe von IPTG induziert werden.

Die Mutationen, die phänotypisch zur Resistenz gegen die Expression von kloniertem Gen E führten, wurden als *pxl* (*PhiX174*-lysis) bezeichnet.

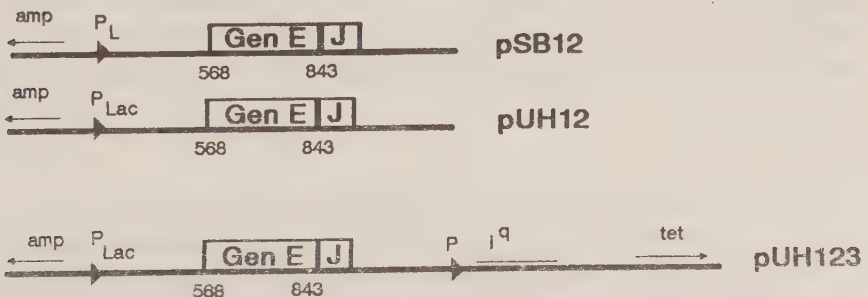


Fig. 8 Vereinfachte Darstellung der Plasmide pUH12, pSB12 und pUH123

Die Plasmide sind als Linie dargestellt. Gen E steht auf den jeweiligen Plasmiden unter der transkriptionellen Kontrolle von P_{lac} (pUH123, pUH12) oder Lambda P_L (pSB12). Von Plasmid pUH123 wird zusätzlich der *lacI^q*-Repressor exprimiert. Die Zahlen unterhalb der Plasmid-Linie geben Nukleotidposition von Gen E auf der *PhiX174*-Genkarte nach Sanger et al. (1978) wieder.

1. Isolierung von Φ X174 Protein E lyseresistenten (*pxl*) Mutanten von *Escherichia coli*

1.1. Lyse von *E. coli* nach Expression des klonierten Gen E und Isolierung von *pxl* Mutanten von *E. coli*

E. coli CSH61 wurde mit Plasmid pUH123 transformiert und in Vollmedium bei 37°C angezogen. In der frühen log-Phase bei O.D.₆₀₀ 0,2 wurde die Kultur geteilt und die Lyse der Bakterien durch Zugabe von IPTG (5 mM Endkonzentration) induziert. Die nicht-induzierte Kultur diente als Kontrolle. Der Verlauf der Bakterienlyse wurde photometrisch bei O.D.₆₀₀ verfolgt (Fig.9).

Die Lyse von *E. coli* CSH61(pUH123) erfolgte 60 min nach Inaktivierung des Repressors und Induktion der Genexpression (Fig.9; Phase I).

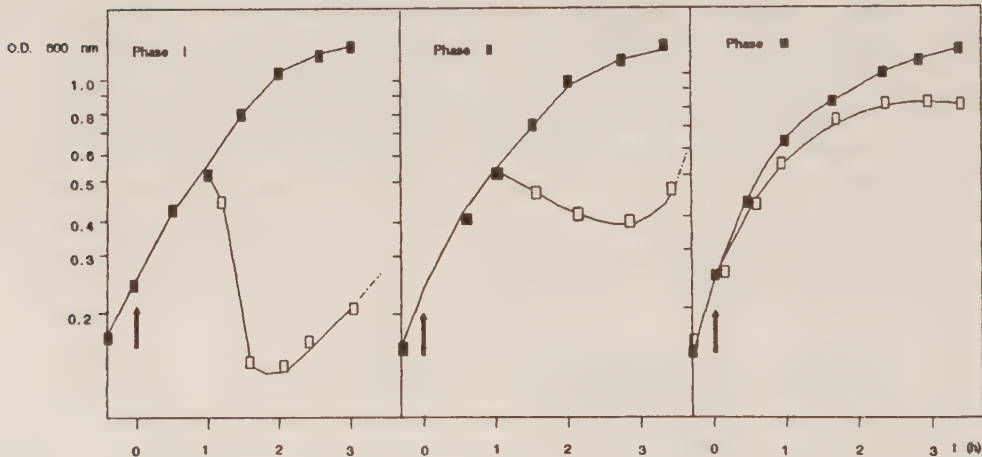


Fig.9 Wachstumsverhalten von *E. coli* CSH61(pUH123) nach Expression von Gen E vom Plasmid pUH123 und spontanes Auftreten von Gen E Produkt-resistenten Mutanten.

Die Gen E Expression in *E. coli* CSH61(pUH123) wurde bei einer O.D.₆₀₀ 0,2 durch Zugabe von IPTG (5 mM) induziert (Pfeil). Der Wachstumsverlauf der induzierten (□) und der nicht-induzierten Kontrolle (■) wurden photometrisch verfolgt. Die Beschreibung der Phasen I-III erfolgt im Text

Nach 90 min war die optische Dichte unter den Wert der Ausgangsdichte gesunken. Während der folgenden 2 h blieb die Zelldichte konstant und nahm dann langsam wieder zu, so daß nach weiteren 5-6 h Inkubation die optische Dichte ungefähr der der nicht-induzierten Kultur entsprach. (Fig.9 , Phase I). Die Lyse-induzierte Kultur wurde über Nacht bei 37°C weiterinkubiert. Mit einem Aliquot dieser Übernachtskultur wurde frisches Vollmedium angeimpft. Die neue Kultur wurde bis zur mittleren log-Phase anwachsen gelassen. Danach wurde zur Induktion der Gen E Expression erneut IPTG zugegeben (Fig.9; Phase II). Diese Schritte wurden so oft wiederholt, bis die Wachstumsrate der induzierten Kultur gleich der der nicht-induzierten war (Fig.9; Phase III).

Zur weiteren Reinigung der **pxl** Mutanten wurden diese auf Selektivplatten mit Ampicillin (500ug/ml) und 10 mM IPTG ausplattiert. Nach mehrmaligem Wiederholen dieser Reinigungsschritte konnten mehrere, unabhängig voneinander isolierte *E. coli* **pxl**-Klonen erhalten werden.

Alle *E. coli* Klone, die **pxl** Mutationen trugen, erhielten die Stammbezeichnung GH und eine Ziffernbezeichnung, die sich auf den jeweiligen Ursprungstamm bezog.

Da das Plasmid pUH123 eine Ampicillin-Resistenz trägt, konnte durch Zugabe von ausreichender Antibiotikakonzentration (200 ug/ml) zunächst das Vorhandensein des Plasmids in den resistenten Klonen vermutet werden, da die chromosomal bedingte Ampicillinresistenz nur 1/10 der plasmidkodierten beträgt. Das Hybridplasmid pUH123 leitet sich vom multicopy-Plasmid pUR222 ab und liegt in jeder Zelle in ungefähr 20-50facher Kopienzahl vor. Es war daher wahrscheinlich, daß die **pxl** Mutation chromosomal- und nicht plasmidbedingt waren. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde Plasmid-DNA aus resistenten **pxl**-Klonen isoliert und in mehrere *E. coli* Stämme transformiert. Plasmid pUH123-Präparationen aus **pxl** Mutanten unterschieden sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität im Agarosegel nicht von Kontroll-Plasmid-DNA und bewirkten unter Induktionsbedingungen der Gen E-Expression die Lyse der transformierten Zellen.

Das lysenegative Verhalten der isolierten *E. coli* **pxl** Mutanten konnte somit nicht auf einer Veränderung des Plasmids pUH123 selbst zurückgeführt werden. Die Resistenz der untersuchten *E. coli* **pxl** Klone war somit sehr wahrscheinlich durch eine chromosomale Mutation der Wirtszelle bedingt.

1.2 Physiologische Charakterisierung von *E. coli* **pxl** Mutanten

Das Wachstumsverhalten von *E. coli* **pxl**-Mutanten unterschied sich nicht von dem von **pxl**⁺-Elternstämmen. Es konnten weder morphologische noch physiologische Veränderungen wie erhöhte Resistenz gegen die Antibiotika Phosphomycin, Colistin oder D-Cycloserin beobachtet werden (Tab.2a). Resistenz gegen EDTA- und Moenomycin-induzierte Autolyse wurde ebenfalls nicht festgestellt. (Tab.2b).

Tab.2a Bestimmung der minimalen Inhibierungskonzentration (MIC) von Antibiotika auf *E. coli pxl⁺*- und *pxl*-Stämmen

Stamm	Antibiotikum		
	Phosphomycin MIC (ug/ml)	Colistin MIC (ug/ml)	D-Cycloserin MIC(ug/ml)
CSH61	5	5	25
CSH61(pUH123)	5	5	25
GH10(pUH123)	5	5	25

E. coli pxl⁺ CSH61, CSH61(pUH123) und *pxl* GH10(pUH123) wurden auf LB-Agarplatten mit verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen ausplattiert. Die Konzentration, bei der ein Wachstum der Zellen noch festgestellt werden konnte, zeigte die minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums an.

Tab.2b Vergleich der Autolyserate von *E. coli pxl⁺* und *pxl* nach Induktion mit EDTA und Moenomycin

Stamm	Generationszeit min	k_{EDTA} $\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$k_{\text{Moen.}}$ $\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
CSH61	45	119	84
CSH61(pUH123)	60	129	53
GH10(pUH123)	60	127	55

E. coli CSH61, *pxl⁺* CSH61(pUH123) und *pxl* GH10(pUH123) wurden bis zu einer O.D.₆₀₀ 0,2 in K-Medium angezoogen und die Autolyse durch EDTA (1 mM, pH 6,5) oder durch Moenomycin (20 ug/ml) induziert. Die Autolyserate wurde über die Konstante k_{EDTA} und k_{Moen} nach der Formel $k = \ln(O.D.1 - \ln O.D.2) / (t_2 - t_1) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ bestimmt.

2. Lokalisation der *pxlA* Mutation auf dem Chromosom von *E. coli* GH11A

Für die Protein E Lyse-Resistenz konnten mehrere Mutationen verantwortlich sein. Der Genort einer der isolierten *pxl* GH10 Klone auf dem *E. coli* Chromosom sollte im weiteren Verlauf der Arbeit näher bestimmt werden. Dabei wurde die *pxl* Mutation, die näher charakterisiert wurde, mit *pxlA* bezeichnet.

2.1. Entfernen des Plasmids pUH123 aus *pxl* Mutanten von *E. coli*

Zur näheren Charakterisierung der *pxl* Mutanten wurde aus *E. coli* GH10(pUH123)-Klonen die Plasmid-DNA mit Coumermycin (Danislevskaya 1980) entfernt. Dazu wurden Übernachtskulturen von GH10-Klonen mit Vollmedium 5fach verdünnt, eine subletale Konzentration von Coumermycin (5 µg/ml) zugegeben und die Kulturen über Nacht bei 37°C inkubiert. Verschiedene Verdünnungsstufen der so behandelten Kulturen wurden auf LB-Platten ohne Antibiotikazusatz ausplattiert, über Nacht inkubiert und die Kolonien durch Replika-Plating auf die plasmidkodierten Resistenzen (Ampicillin 200 µg/ml und Tetracyclin 10 µg/ml) getestet.

Fünf von 400 überprüften Kolonien zeigten einen Ausfall der Antibiotika-Resistenzen, was darauf hindeutete, daß diese Klone das Plasmid pUH123 verloren hatten. In den plasmidfreien *pxl* GH10-Derivaten GH11A, GH11B, GH11C, GH11D und GH11E wurde die Abwesenheit des Plasmids durch gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Minipräparationen im Vergleich zu plasmidtragenden Zellen nachgewiesen.

Der plasmidfreie GH10-Klon GH11A wurde für weitere Untersuchungen herangezogen. Die *pxl* Mutation wird im folgenden mit *pxlA* bezeichnet. Der Genlocus von *pxlA* auf dem *E. coli* Chromosom sollte bestimmt werden.

2.2. Transformationseffizienz der Plasmide pSB12 und pUH12 in *E. coli* GH11A

Aus den bisher beschriebenen Versuchen konnte geschlossen werden, daß die *pxl* Mutation auf einer veränderten Expression von Gen E oder einer veränderten Target-Struktur der Protein E Wirkung beruhte. Sollte dies der Fall sein, dann könnten E-spezifische Plasmide in solchen Zellen gehalten werden, in denen Gen E konstitutiv exprimiert wird. Trifft dies nicht zu, so sollten die Zellen sofort nach Aufnahme der Plasmide pUH12 oder pSB12 absterben, da von diesen Plasmiden Gen E konstitutiv exprimiert wird und der zelluläre genetische Hintergrund von *E. coli* GH11A weder *cl₈₅₇* noch *lacI^q* aufweist.

Die *E. coli* *pxl* Mutante GH11A sollte die Transformation mit diesen Plasmiden überleben, falls durch

die veränderte Wirtsfunktionen entweder die Expression und/oder die Wirkung von Protein E selbst beeinträchtigt ist.

Die Transformationseffizienz von *E. coli* GH11A (*pxlA*) mit Plasmid pSB12 oder pUH12 wurde verglichen mit der von *E. coli* *pxl*⁺ Stämmen, die für pUH12 die Repressoraktivität *lacI*^{q1} auf einem F'-Episom (Stamm *Cal*^{q1}) oder *lacI*^q durch Kotransformation mit dem Plasmid pMC7 tragen. Für Plasmid pSB12 wurde Kotransformation mit dem Plasmid *pcl857* gewählt oder *E. coli* K12ΔH1Δtrp. Als zusätzliche Kontrolle für die Transformation diente der *E. coli* Stamm CSH61 *pxl*⁺, der für beide Promotoren keine Repression besitzt (Tab.3).

Wie in Tab. 3 gezeigt, war die Transformationseffizienz von *E. coli* GH11A, die mit gleichen Plasmidmengen von pSB12 und pUH12 transformiert worden waren, vergleichbar mit der von Zellen, die entsprechende Repressoren für die Gen E vorgeschalteten Promotoren besitzen.

Tab.3 Transformationseffizienz der Plasmide pSB12, pUH12 und pUH123 in *E. coli* *pxl*⁺ und *pxlA*

E. coli	Plasmid pSB12 cfu/ug DNA	Plasmid pUH12 cfu/ug DNA	Plasmid pUH123 cfu/ug DNA
CSH61	0	0	2 x 10 ⁶
CSH61(pMC7)	n.b.	2 x 10 ⁶	n.b.
<i>Cal</i> ^{q1}	n.b.	1 x 10 ⁶	n.b.
CSH61(<i>pcl857</i>)	5 x 10 ⁶	n.b.	n.b.
K12ΔH1Δtrp	1,7 x 10 ⁶	n.b.	n.b.
GH11A	2 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶

Die *E. coli* *pxl*⁺-Stämme *Cal*^{q1}, CSH61(pMC7) und CSH61 wurden mit Plasmid-DNA pUH12 und K12ΔtrpΔH1, CSH61(*pcl857*) und CSH61 mit Plasmid-DNA pSB12 transformiert. Die *E. coli* *pxlA* Mutante GH11A wurde mit den Plasmiden pUH12, pSB12 und pUH123 transformiert und die Transformationseffizienz der Stämme verglichen. Transformationen, aus denen keine Transformanten hervorgingen, wurden mit 0 angegeben. Von einigen Stämmen wurde die Transformationsrate nicht bestimmt (n.b.).

2.3. Transposonmutagenese von *E. coli* GH11A mit Tn10

Die Selektion auf den genetischen Marker *pxIA* bezog sich bisher lediglich auf die Transformierbarkeit von *E. coli* GH11A mit den Lyseplasmiden pSB12 und pUH12. Um die genetische Kartierung zu vereinfachen, sollte durch Transposition ein Stamm konstruiert werden, bei dem die Selektion auf *pxIA* durch Kopplung mit dem Tn10 Resistenzmarker (*Tet*^r) erfolgen kann.

Für die Transposonmutagenese wurden Lambda NK55 verwendet, in dessen Genom Tn10 integriert ist. Auf Grund einer *am*-Mutation im Gen 0 kann Lambda NK55 in suppressorfreien Stämmen nicht vermehrt werden. Andere Mutationen verhindern die Integration des Phagengenoms ins Wirtschromosom. Nach Infektion mit Lambda NK55 werden Zellen nur dann *Tet*^r, wenn Tn10 vom Phagen ins Wirtschromosom transponiert (Kleckner et al., 1978). Eine mögliche Integration kann allerdings zufällig an jeder Stelle des Chromosoms erfolgen. Zur Selektion einer benachbarten Lokalisation von *pxIA* und Tn10 sollte die gemeinsame P1-Transduktion beider Marker auf einen Empfänger-Stamm ausgenutzt werden.

Die Lambda NK55-infizierten GH11A Zellen wurden zunächst auf Vollmedium mit Tetracyclin (10 µg/ml) ausplattiert. Von den ungefähr 3000 erhaltenen *Tet*^r-Kolonien sollten diejenigen selektioniert werden, die Tn10 in der Nähe von *pxIA* integriert hatten. Dazu wurde auf dem Kolonienpool der *Tet*^r-Klone ein P1-Lysat gezogen und damit *E. coli* CSH57 infiziert. Die erhaltenen CSH57 *Tet*^r-Transduktanten (*E. coli* GH13) wurden mit pUH12 oder pSB12 nachtransformiert. Auf solche Zellen, die *Tet*^r waren und die Anwesenheit der Plasmide überlebten, war gemeinsam mit Tn10 auch *pxIA* übertragen worden. Durch mehrfache Wiederholung der Transduktionsexperimente, wobei GH13 als Donor diente, konnte gezeigt werden, daß Tn10 zu fast 95% mit *pxIA* kotransduziert wurde und somit in unmittelbarer Nachbarschaft zu *pxIA* ins Chromosom integriert war.

2.4. F'-Komplementationsanalysen der *pxIA* Mutation

Durch Einbringen von F'-Faktoren in Mutantenzellen können rezessive Mutationen durch F'-Faktor-kodierte Genprodukte komplementiert werden, wodurch die Genloci dieser Mutationen grob auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert werden.

Die isolierte *E. coli* *pxIA* Mutante GH11A leitet sich von einem Hfr-Stamm ab. Die *pxIA* Mutation wurde daher durch P1-Transduktion auf einen geeigneten F'-Empfängerstamm (CSH57-Derivat) übertragen, der eine Rekombinationsdefizienz (*recA*) als zusätzlichen zellulären Hintergrund besaß.

Die Konstruktion des Empfängerstamms GH16 (F'*pxIA* *zho::Tn10* *recA*) ist in Fig. 10 wiedergegeben.

E. coli GH16 wurde für die Komplementationsanalyse mit den Plasmiden pcls7 und pSB12 transformiert und mit verschiedenen F'-Faktor-haltigen Stämmen gekreuzt. Die Donorstämme und der Rezipientenstamm wurden nach Anzucht in Minimalmedium bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,4 im Verhältnis

1:20 gemischt, 45 min bei 30°C inkubiert und auf Selektivplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte sowohl bei 30°C als auch bei 42°C. Falls Komplementation von *pxlA* durch das Wildtypallel *pxl*⁺ erfolgen würde, sollte es bei Gen E Expression nach Inaktivierung des *cl₈₅₇* Repressors bei 42°C nicht zur Kolonienbildung kommen.

Das Ergebnis der Kreuzungsversuche ist in Fig. 11 zusammengefaßt.

Durch keinen der überprüften F'-Faktoren erfolgte eine Komplementation der *pxlA* Mutation, da sowohl bei 30°C als auch bei 42°C Wachstum der Zellen unter selektiven Bedingungen erfolgte. Dies wies darauf hin, daß das mutierte *pxlA*-Allel dominant über das *pxl*⁺-Wildtypallel ist.

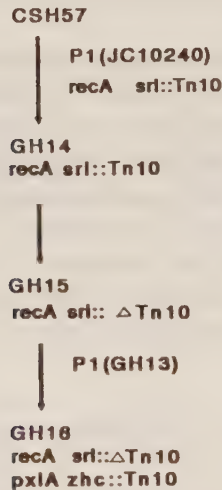


Fig. 10 Stammbaum der CSH57-Derivate

Auf *E. coli* JF10240 wurde ein P1-Lysat gezogen und *E. coli* CSH57 mit den P1 Phagen infiziert. Aus den erhaltenen *E. coli* GH14 Transduktanten wurde *Tn10* entfernt. Die *Tn10*-freien Zellen wurden mit GH15 bezeichnet. Anschließend wurde auf *E. coli* GH15 die *pxlA* Mutation mit einem P1-Phagenlysat von *E. coli* GH13 transduziert.

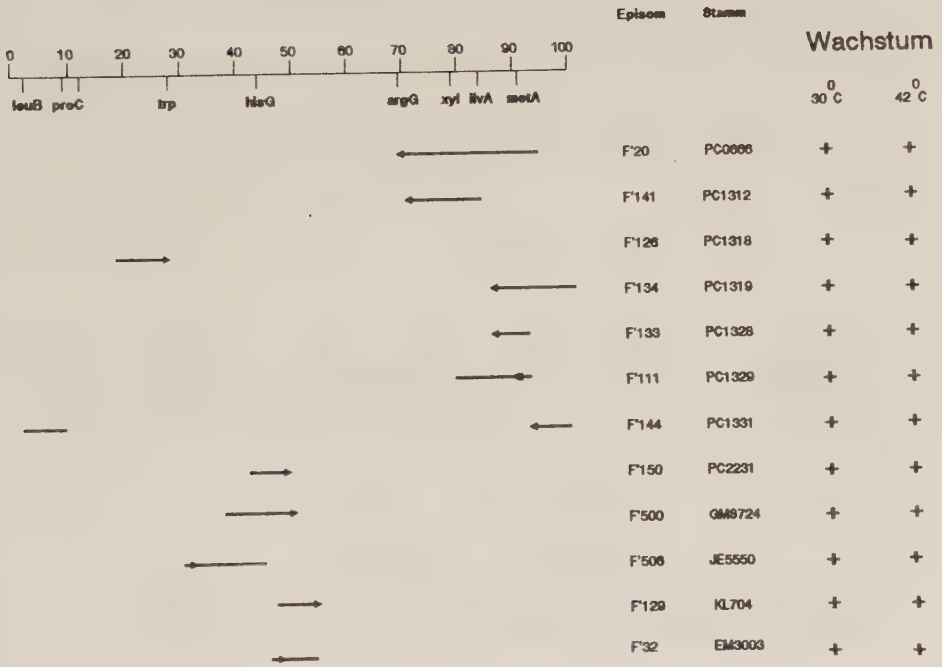


Fig. 11 F'-Komplementationsanalyse der *pxlA* Mutation von *E. coli* GH16

F'-Episome, die unterschiedliche Bereiche des *E. coli* Chromosoms überdecken, wurden durch F'-Faktor-Kreuzungen in GH16(*pxl857pSB12*) eingebracht. Durch Markertest wurde die Anwesenheit der F'-Episome in *pxlA* GH16(*pxl857pSB12*) bestätigt und die Kolonien auf Komplementation von *pxlA* bei 30°C und 42°C überprüft.

2.5. Kartierung der *pxlA* Mutation durch Chromosomentransfer

Die durchgeführten Komplementationsanalysen gaben keinen Hinweis auf den Genort von *pxlA* auf dem Chromosom von *E. coli* GH16. Die genetische Lokalisation der Mutation wurde daher durch Chromosomentransfer-Analysen weitergeführt.

Durch P1-Transduktion wurde *pxlA*, gekoppelt mit *Tet^r*, von Stamm GH13 auf Hfr-Stämme, mit verschiedenen chromosomalen Startpunkten der Konjugation (Fig.12), übertragen. Die Hfr-Ausgangsstämme und ihre *pxlA*-*Tet^r*-Derivate sind in Tab.4 zusammengefaßt.

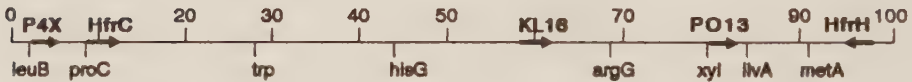


Fig. 12 Chromosomentransferrichtung von *E. coli* Hfr-Stämmen

Das *E. coli* Chromosom ist als Linie dargestellt. Die Startpunkt des Transfers ist für die verschiedenen Hfr-Stämme durch die Pfeilrichtung wiedergegeben.

Tab.4 P1-Transduktion der genetischen Marker *pxlA*-Tn10 auf *E. coli* Hfr-Stämme

Rezipient	Transferpunkt	Derivat (<i>pxlA</i> -Tn10)
AT2457	HfrH	GH20
CSH61	HfrC	GH21
AT978	KL16	GH22
KL227	P4X	GH23
KL228	PO13	GH25

Beim Chromosomentransfer von Hfr-Stämmen auf F'-Stämme werden die nahe dem Transferpunkt gelegenen Gene als frühe Marker mit größerer Häufigkeit übertragen als späte Gene. Aus der Anzahl der Rekombinanten in einem Kreuzungsversuch läßt sich somit ungefähr der Abstand von Genen zum Eintrittspunkt des F'-Chromosoms ableiten.

Aufgrund der Kopplung von Tn10 mit **pxIA** konnte in den nachfolgenden Konjugationsexperimenten durch Selektion auf Tet^r auch gleichzeitig der Eintrittspunkt von **pxIA** beim Chromosomentransfer bestimmt werden.

Als Rezipient diente der polyauxotrophe Stamm CSH57. Jeder der **pxIA** Hfr-Stämme wurde in einem unterbrochenen Transfer (60 min) mit CSH57 gekreuzt, wobei die Gegenselektion auf den Donor mit Streptomycin (25ug/ml) erfolgte. Die Rekombinanten wurden durch Ausplattieren auf Minimalmedium oder auf Vollmedium mit Tet (10 ug/ml) selektioniert. Die Ergebnisse der unterbrochenen Konjugationsexperimente sind in Tab.5 zusammengestellt.

Kreuzung von CSH57 mit GH21 zeigte, daß Tn10 mit geringerer Effizienz als **leuB**⁺ **ilvA**⁺ **metA**⁺ und höherer als **argG**⁺ und **hisG**⁺ übertragen wurden. Die Zahl der Tet^r-Rekombinanten nach Kreuzung von CSH57 mit GH20 war geringer als die der **hisG**⁺ **argG**⁺ und höher als **ilvA**⁺, **leuB**⁺. Die Kreuzung von CSH57 mit GH22 ergab, daß die Tet^r mit der geringsten Rate im Vergleich zu den selektionierten Genen **hisG**, **trp**, **leuB**, **ilvA** und **metA** übertragen wurde. Tn10 mußte sich somit auf dem Chromosom zwischen den Genen **argG** und **leuB** (min 69-2 auf dem E. coli Chromosom) befinden (Fig. 12).

Chromosomentransfer von GH25, dessen F'-Faktor seinen Replikationspunkt PO13 zwischen den Genen **argG** und **leuB** (Fig. 12) hat, auf CSH57 ergab eine hohe Rekombinationsrate für Tet^r und eine sehr geringer für **argG**⁺ **hisG**⁺ **trp**⁺ und **metA**⁺, woraus geschlossen wurde, daß Tn10, und damit auch **pxIA**, proximal zum Replikationspunkt PO13 liegen muß (min 84).

Zur näheren Lokalisation von Tn10 (**pxIA**) wurden P1-Transduktionsexperimente durchgeführt, bei denen Stämme mit chromosomalen Markern zwischen der min 82-85 des E.coli Chromosoms als Rezipienten dienten.

Tab. 5 Konjugationsexperimente zur Bestimmung der Genlokalisierung von *pvlA*

Rezipient	Donor	selektionierter Marker ^a	Zahl der Rekombinanten ^b
CSH57	GH20	hisG ⁺	1,6 x 10 ⁵
		argG ⁺	6,0 x 10 ⁴
		ilvA ⁺	2,6 x 10 ⁴
		tet	4,2 x 10 ⁴
		leuB ⁺	1,5 x 10 ⁴
CSH57	GH21	leuB ⁺	1,0 x 10 ⁵
		metA ⁺	3,5 x 10 ⁴
		ilvA ⁺	2,9 x 10 ⁴
		tet	1,8 x 10 ⁴
		argG ⁺	1,3 x 10 ³
		hisG ⁺	2,0 x 10 ²
CSH57	GH22	hisG ⁺	1,0 x 10 ⁵
		trp ⁺	1,0 x 10 ⁴
		leuB ⁺	4,0 x 10 ³
		metA ⁺	8,0 x 10 ²
		ilvA ⁺	8,0 x 10 ²
		tet	1,0 x 10 ²
CSH57	GH25	tet	3,0 x 10 ⁵
		mtl ⁺	1,9 x 10 ⁵
		argG ⁺	2,3 x 10 ⁴
		hisG ⁺	1,5 x 10 ⁴
		trp ⁺	1,0 x 10 ⁴
		metA ⁺	0,6 x 10 ³

^{a.)} Gegenselektion mit Streptomycin (25µg/ml)^{b.)} 1x10⁸ Hfr-Zellen wurden mit 2x10⁷ F⁻-Zellen in 5 ml Vollmedium 60 min inkubiert. Die Zahl der Rekombinanten wird pro ml Kultur angegeben.

2.6. Kartierung der *pxlA* Mutation durch P1-Transduktion

2.6.1. Zwei-Faktor-Kreuzung

In einem ersten Schritt wurden die aus dem Chromosomentransfer von Tn10 ermittelten Daten dazu benutzt, den Genort für Tn10 (*pxlA*) auf dem *E. coli* Chromosom näher zu lokalisieren. Bei diesen Kreuzungsversuchen wurde Tn10 mit hoher Effizienz von HfrC und P013 übertragen, und muß somit zwischen den Genen *argG* und *metA* lokalisiert sein.

Es wurden Zwei-Faktor-Kreuzungsversuche mit dem Phagen P1 durchgeführt, wobei auf die Rekombinanten der Auxotrophiemarker des Rezipienten und auf Tet^r selektioniert wurde. Für die Transduktionsexperimente wurden Markerstämme ausgewählt, die im Bereich der Minute 80 und 90 der *E. coli* Genkarte Auxotrophien aufweisen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab.6 zusammengefaßt.

Es konnte keine Kopplung von Tn10 mit *xyl mtl pyrE metA ubiD* festgestellt werden. Für *ilvA* und Tn10 betrug die Kopplung 16%, für Tn10 und *uncB* 53%. Tn10 gab somit eine höhere genetische Kopplung mit *uncB* als mit *ilvA*. Aus diesem Grund erfolgten die weiteren Transduktionsexperimente mit Stämmen, die Defekte in den Genen *bgIR glmS asnA rbsK* aufwiesen.

Die Kopplung für *rbsK* und Tn10 betrug 30%, für *asnA* und Tn10 lag sie zwischen 31%-46%. Eine noch höhere Kotransduktionsfrequenz von 63% konnte zwischen *glmS* und Tn10 festgestellt werden. Die höchste ermittelte Kopplungsrate zeigte sich zwischen Tn10 und *bgIR*, die fast 96% betrug (Tab.6). Die durchgeführten Transduktionsexperimente zeigten somit eine erhöhte genetische Kopplung mit Genen, die im Bereich von min 83 auf dem *E. coli* Chromosom kartieren und bestätigten die durch den Chromosomentransfer ungefähr ermittelte Lokalisation von Tn10-*pxlA* zwischen min 82 und 85.

Die Kartierung der relativen Position von Tn10 durch Zwei-Faktor-Kreuzungen machte es wahrscheinlich, daß sich Tn10 innerhalb des Segments *bgIR-asnA* in direkter Nachbarschaft zu *bgIR* befindet. Die Anordnung der Gene ist auf einem Ausschnitt der *E. coli* Genkarte in Fig. 13 wiedergegeben.

Tab.6 Kotransduktionsanalysen von Tn10 durch Zwei-Faktor-Kreuzungen mit dem Phagen P1

Donor	Rezipient	selektionierter Marker ^a	nicht selektionierter Marker ^b	Kotransduktionsfrequenz
GH21	CSH57	tet	ilvA ⁺	20 (50/169)
GH21	CSH57	ilvA ⁺	tet	16 (31/89)
GH21	CSH57	tet	xyl ⁺	0 (0/169)
GH21	CSH57	tet	mtl ⁺	0 (0/170)
GH21	JF1130	tet	pyrE ⁺	0 (0/100)
GH25	JF1130	pyrE ⁺	tet	0 (0/63)
GH21	AN382	uncB ⁺	tet	53 (131/247)
GH25	AB2134	metA ⁺	tet	0 (0/115)
GH25	CA8306	cya ⁺	tet	0 (0/73)
GH25	AN66	ubiD ⁺	tet	0 (0/91)
GH25	E110	glms ⁺	tet	63 (96/153)
GH25	JF496	tet	asnA ⁺	46 (87/188)
GH25	AA100	rbsK ⁺	tet	30 (58/188)
GH25	JF496	tet	bgIR ⁺	96 (180/188)
GH25	JF496	asnA ⁺	tet	31 (57/182)
GH25	JF496	asnA ⁺	bgIR ⁺	26 (48/182)

^a) Die Selektion erfolgte in erster Linie auf diese Marker.

^b) Anschließend wurde die Kolonie auf die Übertragung der weiteren Marker getestet.

2.6.2. Drei-Faktor-Kreuzungen

Um die Anordnung der Genloci von **bgIR** **asnA** und **Tn10** **pxIA** festzulegen, wurden weitere Transduktionsexperimente in Form von Drei-Faktor-Kreuzungen durchgeführt.

Dazu wurden Stämme mit der Markerkombination **asnA** **bgIR** benötigt. Als Rezipient der P1-Transduktion bot sich JF448 (**asnA** **bgIR** **rbsK**) an, der mit dem Donor GH21 (**pxIA** **zhc::Tn10**) gekreuzt wurde. In ersten Kreuzungsversuchen wurde jeweils auf den Mittelmarker **Tn10** und in analoger Weise auf **asnA** als außenliegenden Marker selektioniert. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Bei Selektion auf **Tn10** als Mittelmarker wurde das Segment **Tn10-bgIR** mit 52%-65%, das Segment **rbsK-Tn10-bgIR** mit 30% und **asnA-Tn10-bgIR** mit 44% kotransduziert (Tab.7). Wesentlich seltener erfolgte eine Übertragung von **Tn10** allein (0,5%-1%) und **asnA-Tn10** (2,6%) und **rbsK-Tn10** (3,8%). Die hohe Rekombinationshäufigkeit von **Tn10-bgIR** läßt schließen, daß beide Gene in einem Zwei-Cross-Over übertragen wurden und die Kombination **asnA-Tn10** zur 4-Cross-Over-Klasse gehört. Daraus ergibt sich die Reihenfolge der Genanordnung **bgIR-Tn10-asnA**.

In Kreuzungsversuchen, in denen auf **asnA** als Mittelmarker selektioniert wurde, erfolgte die Transduktion der Segmente **asnA-rbsK** mit einer Frequenz von ungefähr 35%. Die Rekombinationshäufigkeit von **rbsK-asnA-Tn10** und **rbsK-asnA-bgIR** betrug etwa 20% und 19%. Hingegen fiel die Zahl der Rekombinanten mit **asnA-Tn10** oder **asnA-bgIR** auf 7%. Selektion von **asnA** als außenliegenden Marker ergab eine Kotransduktionsrate für **asnA-Tn10-bgIR** von 20%, für **asnA-Tn10** von 10% und **asnA-bgIR** von nur 4,4% (Tab.7). Auch die Kotransduktionsraten dieser Kreuzungsversuche gab die Reihenfolge der Gene mit **bgIR-Tn10-asnA-rbsK** an. Die Ergebnisse dieser Versuche waren ebenfalls in Übereinstimmung mit den Kartierungsdaten der vorangegangenen Zwei-Faktor-Kreuzungs- experimente.

Um die Lokalisation von **pxIA** zu **Tn10** und den übrigen selektionierten Markern zu bestimmen, wurden die in den Drei-Faktor-Kreuzungsexperimenten erhaltenen Rekombinationsklassen auf **pxIA** durch Transformation mit Plasmid pSB12 überprüft. Die Kreuzungsklasse **bgIR-Tn10** wurde zu 90% mit **pxIA** kotransduziert, **bgIR-Tn10-asnA** zu 58% und **bgIR-Tn10-rbsK** zu 28%. **Tn10-asn**, **Tn10-ilvA** zeigten keine Übertragung von **pxIA**.

Die Zuordnung von **pxIA** zu den getesteten Markern ergab eine unmittelbare Nachbarschaft zu **bgIR-Tn10**. Aufgrund der sinkenden Kotransduktionshäufigkeit zu **asnA** (58%), **rbsK** (28%) und **ilvA** (0%) wurde die Genanordnung mit **pxIA-bgIR-Tn10-asnA-rbs-ilvA** ermittelt (Fig. 13).

Tab.7 Kotransduktionsanalysen von Tn10 durch Drei-Faktor-Kreuzungen mit dem Phagen P1

Donor	Rezipient	selektionierter Marker ^a	Transduktantenklasse ^b	Transduktionsfrequenz in %
GH21	JF448	tet	rbsK ⁺ bglR ⁺	30,0 (56/188)
			rbsK ⁻ bglR ⁻	0,5 (1/188)
			rbsK ⁻ bglR ⁺	65,0 (122/188)
			rbsK ⁺ bgl ⁻	3,8 (7/188)
		tet	ansA ⁺ bglR ⁺	44,0 (83/188)
			asnA ⁺ bglR ⁻	2,6 (5/188)
			asnA ⁻ bglR ⁺	52,0 (98/188)
			asnA ⁻ bglR ⁻	1,0 (2/188)
		asnA ⁺	tet ^r bglR ⁺	20,0 (39/182)
			tet ^r bglR ⁻	10,0 (18/182)
			tet ^s bglR ⁺	4,4 (8/182)
			tet ^s bglR ⁻	65,0 (117/182)
		asnA ⁺	rbsK ⁺ tet ^r	22,0 (40/182)
			rbsK ⁺ tet ^s	34,0 (62/182)
			rbsK ⁻ tet ^r	9,0 (17/182)
			rbsK ⁻ tet ^s	35,0 (63/182)
		asnA ⁺	bglR ⁺ rbsK ⁺	19,0 (35/182)
			bglR ⁺ rbsK ⁻	7,0 (13/182)
			bglR ⁻ rbsK ⁺	35,7 (67/182)

^{a.)} Auf diese Marker wurde in erster Linie selektioniert.^{b.)} Die Nachselektion erfolgte auf diese Marker. Dabei wurden die relativen Zahlen der aufgetretenen Rekombinanten mit entsprechenden Markerkombinationen ermittelt.

Die **pxIA** Mutation, die für die phänotypische Resistenz von *E. coli* gegen die Wirkung des Lysegens E des Bakteriophagen PhIX174 verantwortlich ist, befindet sich damit bei min 83,3 auf der Chromosomenkarte von *E. coli*.

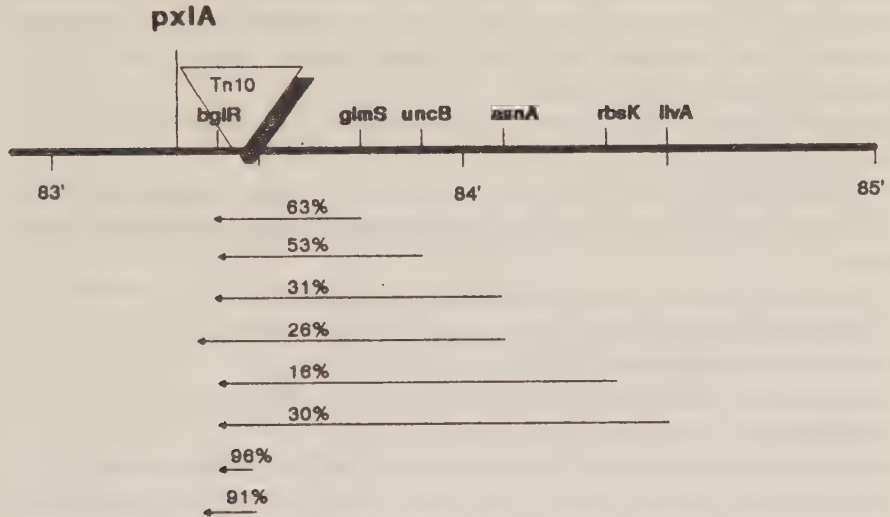


Fig. 13 Genetische Lokalisation der **pxIA** Mutation auf dem Chromosom von *E. coli*

Die Daten wurden aus den P1-Transduktionsexperimenten der Zwei-Faktor-Kreuzung (Tab.6) und der Drei-Faktor-Kreuzung (Tab.7) zusammengestellt. Das *E. coli* Chromosom ist als Linie dargestellt. Die Prozentzahlen geben die Kotransduktionsfrequenzen der Zwei-Faktor-Kreuzungsversuche wieder. Der Abstand der Gene wurde mit den Daten der Zwei- und Drei-Faktor-Kreuzungsversuche nach der Formel von Wu (1966) berechnet, wobei als maximale Verpackungseinheit des Bakteriophagen P1 2,3 min des *E. coli* Chromosoms angenommen wurden. Ein Korrekturfaktor von 0,25 min wurde von 2,3 min subtrahiert, wenn der Donorstamm das Transposon **Tn10** trug. Dabei wurde die Länge von **Tn10** (9,5kb) von Kilobasen zu min *E. coli* Chromosom verändert (38 kb = 1 min).

C. Untersuchungen zur molekularen Ursache der Resistenz von *E. coli* **pxlA** Mutanten nach Expression von plasmidkodiertem Gen E

Nach Expression von plasmidkodiertem Gen E lysierten **pxlA** Mutanten von *E. coli* nicht mehr. Neben dieser phänotypischen Resistenz waren keine auffälligen physiologischen und morphologischen Veränderungen von *E. coli* **pxlA** Mutanten sichtbar. Ein uneingeschränktes Wachstum der Zellen in Anwesenheit von Lyseplasmiden setzte jedoch modifizierte zelluläre Funktionen voraus, die zur Ausprägung des neuen Phänotyps führen.

Folgende Mechanismen konnten für ein normales Wachstum von **pxlA** Mutanten in Gegenwart von Gen E vermutet werden:

1. Die Transkription von Gen E wird durch zelluläre Faktoren frühzeitig terminiert oder die Gen E-spezifische mRNA wird derart prozessiert, daß kein funktionsfähiges Protein E translatiert werden kann.
2. Protein E wird translatiert und posttranslational durch Proteasen gespalten.
3. Die Protein E-Synthese wird in den Zellen durch Veränderung der Translationsinitiation oder -effizienz auf eine subletale Konzentration verringert.
4. Protein E wird in ausreichenden, lytisch wirksamen Konzentrationen gebildet. Modifikationen der Membran lassen eine Integration von Protein E jedoch nicht zu.
5. Die Protein E-Expression ist erhöht und fällt funktionslos als Einschlußkörper (inclusion body) aus.
6. Ein veränderter zellulärer Faktor (z. B. ein Membranprotein) verhindert durch Komplexbildung (Protein-E-Protein-X-Komplex) die Protein E Wirkung oder stört grundsätzlich eine notwendige Protein E-Protein E Interaktion.

Es wurde daher untersucht, inwieweit sich die chromosomale **pxlA** Mutation von *E. coli* auf die Expression von Gen E (Transkriptions- und Translationsprodukte) in phageninfizierten Zellen und unter plasmidkodierten Bedingungen auswirkt.

1. Nachweis der plasmidkodierten Gen E-Expression in *pxiA* Mutanten von *E. coli*

1.1. Komplementation der *PhiX174am3* Mutation durch das plasmidkodierte Gen E in *pxiA* Mutanten von *E. coli*

PhiX174am3 Phagen weisen im E-spezifischen Leserahmen ein Stoppcodon (Codon 7) auf (Barrell et al., 1976). Obwohl intrazellulär reife *PhiX174am3*-Phagenpartikel gebildet werden, lysieren die infizierten Zellen aufgrund der fehlenden Protein E Funktion nicht. Durch einen Komplementationstest wurde versucht nachzuweisen, inwieweit Protein E in *E. coli pxiA* Mutanten gebildet wird und in der Lage ist den Defekt der Gen *Eam3* Mutation auszugleichen.

PhiX174am3 Phagen können nur *E. coli* C Stämme infizieren. Durch P1-Transduktion wurde daher zuerst *pxiA* auf *E. coli* C (PC1363) übertragen und der Stamm GH19 *pxiA* konstruiert.

Der Phagentiter von *PhiX174wt* und *PhiX174am3* auf den Stämmen GH19, GH19(pSB12), GH19(pcl857pSB12), PC1363, PC1363(pcl857pSB12), und HF4714 (*E. coli* C Suppressorstamm) wurde mit der Overlay-Methode nach Adams (1959) bestimmt (Tab.8). Infektion mit *PhiX174wt* Phagen führte sowohl bei *E. coli* C wt (PC1363) als auch bei dem konstruierten *E. coli* C *pxiA* (GH19)-Stamm zur Freisetzung intrazellulär gebildeter Phagen (Tab. 8). Die *pxiA* Mutation hatte somit keinen Einfluß auf die Phagenreplikation selbst und nur unwesentlich auf die phagenspezifische Lyse von *E. coli* GH19, GH19(pSB12) mit plasmidkodierter konstitutiver Gen E-Expression und GH19 (pcl857pSB12) mit reprimierter plasmidkodierter Gen E Expression (Tab.8).

Der Titer von *PhiX174am3* auf Stamm GH19(pSB12) war im Vergleich zu *E. coli* GH19 um ungefähr fünf Zehnerpotenzen erhöht, was auf eine Komplementation der Gen E am3 Mutation des Phagen durch das plasmidkodierte Gen E hinwies. In *PhiX174am3*-infizierten Zellen von GH19(pSB12) war somit die Synthese von plasmidkodiertem Protein E möglich. Der unter diesen Bedingungen erhaltene Titer war mit der Suppression der am-Mutation in Stamm HF4714 vergleichbar. Unter reprimierten Bedingungen plasmidkodierter Gen E-Expression (Inkubation bei 28°C) bei *E. coli* PC1363(pcl857pSB12) und GH19(pcl857pSB12) erfolgte, wie zu erwarten, keine Komplementation des Gen *Eam3* Defekts.

Infektion der plasmidfreien Stämme PC1363 *pxiA*⁺ und GH19 *pxiA* mit *PhiX174am3*-Phagen ergab einen Titer von 4×10^4 pfu/ml. Dieser Titer entsprach dem normalen Anteil revertierter am3-Mutanten im eingesetzten Phagen-Stock. Wurden die Stämme PC1363(pcl857pSB12) und GH19(pcl857pSB12) mit *PhiX174am3* infiziert, so wurde im Vergleich zu den plasmidfreien Elternstämmen ein um 50-100fach erhöhter Titer festgestellt.

Tab.8 Bestimmung des Phagentiters von PhiX174wt und PhiX174am3 auf *E. coli* C *pxl*⁺ und *E. coli* C *pxlA* Mutanten

Stamm	Titer PhiX174wt pfu/ml	Titer PhiX174am3 pfu/ml
PC1363	8×10^9	4×10^4
PC1363(pcl857pSB12)	6×10^9	4×10^6
GH19	4×10^9	4×10^4
GH19(pSB12)	5×10^9	2×10^9
GH19(pcl587pSB12)	4×10^9	2×10^6
HF4714	1×10^{10}	1×10^9

E. coli C *pxl*⁺ und *pxlA* Stämme wurden in Vollmedium bis O.D.₆₀₀ 0,3 bei 28°C angezogen. Der Phagentiter einer Stocklösung von PhiX174wt und PhiX174am3 wurde mit den aufgeführten Stämmen bestimmt. Nach 8 h Inkubation bei 28°C wurden die Plaques ausgezählt und die Anzahl der Plaques pro ml (pfu) bestimmt.

Dies konnte seine Ursache in der möglichen Rekombination von Phagen- mit der Plasmid-DNA haben, da beide DNA-Arten in einer infizierten Zelle in großen Koplenzahlen vorliegen. Bei einer Annahme von je 20 PhiX174 RF-DNA- und 20 pSB12- Molekülen pro Zelle ergäbe sich dabei eine Rekombinationsrate von 2×10^{-7} .

Der mit der amber-Suppression (*E. coli* HF4714) vergleichbare Titer von PhiX174am3 auf GH19(pSB12) ließ auf eine konstitutive Expression von Gen E und eine ausreichende Stabilität von funktionsfähigem Protein E in diesem System schließen. Ferner hatte die *pxlA* Mutation keinen feststellbaren Einfluß auf die Entwicklung von reifen Phagenpartikeln in GH19-Zellen. Der biologische Test Protein E durch Komplementation des Defekts von PhiX174am3 Phagen nachzuweisen, stellte bei der für die Bakterienlyse geringen Menge an Protein E ein empfindliches Maß dar.

Dies eher unerwartete Ergebnis fand durch noch darzustellende Untersuchungen seine Erklärung. Es konnte darin gezeigt werden, daß die *pxlA* Mutation eine Spaltung E-spezifischer mRNA-Sequenzen bewirkt. Da Gen E wie bereits in der Einleitung ausgeführt auf jeder PhiX174 spezifischen mRNA vorkommt, wurde die *pxlA*-Aktivität durch die Vielzahl phagenspezifischer mRNA-Moleküle austitriert und in ihrer Wirkung aufgehoben.

1.2. Nachweis von plasmidkodiertem Protein E in *pxiA* Mutanten mittels SDS-PAGE und Immunoblot

Nach Gen E Expression von Plasmiden mit starken Promotoren (P_L) war es nur bedingt möglich, Protein E nachzuweisen (Bläsi 1987). In *pxiA* Mutanten, die konstitutiv Gen E vom Plasmid exprimieren, sollte Protein E nachweisbar sein, falls es nicht durch veränderte Wirtsfunktionen sehr rasch in der Zelle abgebaut wird. Gesamtzellproteine von *E. coli* GH11A(pSB12), GH13(pSB12) und GH56(pSB12) wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Nach Anfärben der Proteinbanden mit Coomassie konnte Protein E jedoch nicht identifiziert werden. Auch im Immunoblot mit β -Gal-E'-52-Antiserum (Bläsi 1987) konnte Protein E in *pxiA* Mutanten nicht identifiziert werden. Auch bei konstitutiver Expression von Gen E war die Intrazelluläre Molekülzahl von Protein E in *pxiA* Mutanten nicht erhöht und lag unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

2. Nachweis von Protein D und Protein E in *pxiA* Mutanten von *E. coli*

Gen E liegt vollständig innerhalb der Gen D Sequenz und wird mit einer +1 Leserasterverschiebung zu Gen D translatiert (siehe Genkarte in Einleitung Fig.1).

In Φ X174-infizierten Zellen wird Gen D mit 100facher Effizienz exprimiert im Vergleich zu Gen E (Pollock et al., 1978). Die Klonierung von Gen D und damit auch Gen E unter der Kontrolle von Lambda P_L in Plasmid pSB35 (Fig.14) machte es möglich, die Expression beider Gene getrennt vom Phagensystem zu untersuchen (Bläsi 1987).

So konnte in einer parallel durchgeführten Doktorarbeit (Bläsi 1987) gezeigt werden, daß unter diesen Bedingungen Protein D im Vergleich zu Protein E als prominente Proteinbande im SDS-Gel auftritt.

Mutationen der Wirtszellen, die Einfluß auf die Gen D/E-spezifische mRNA haben, würden gleichzeitig die Translation von Gen D beeinträchtigen. Direkte Einwirkung auf Protein E durch proteolytische Spaltung würde jedoch die Protein D Synthese nicht beeinträchtigen. Durch Nachweis und Quantifizierung von Protein D nach Expression vom Plasmid pSB35 aus können somit Rückschlüsse auf den Einfluß der *pxiA* Mutation auf die Gen E-spezifische mRNA gezogen werden. Dieser Test wurde in den folgenden Untersuchungen angewandt.

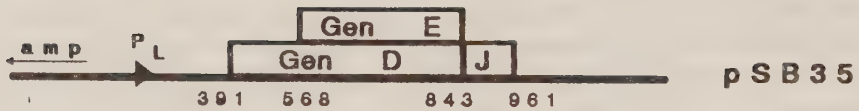


Fig.14 Darstellung des Plasmids pSB35

Das Plasmid pSB35 ist als Linie dargestellt. Die Gen D und E stehen unter transkriptioneller Kontrolle von Lambda P_L. Die Zahlen unterhalb der Plasmid-Linie geben die Nukleotidpositionen der Gene D und E auf dem PhiX174 Genom (Sanger et al., 1978) wieder.

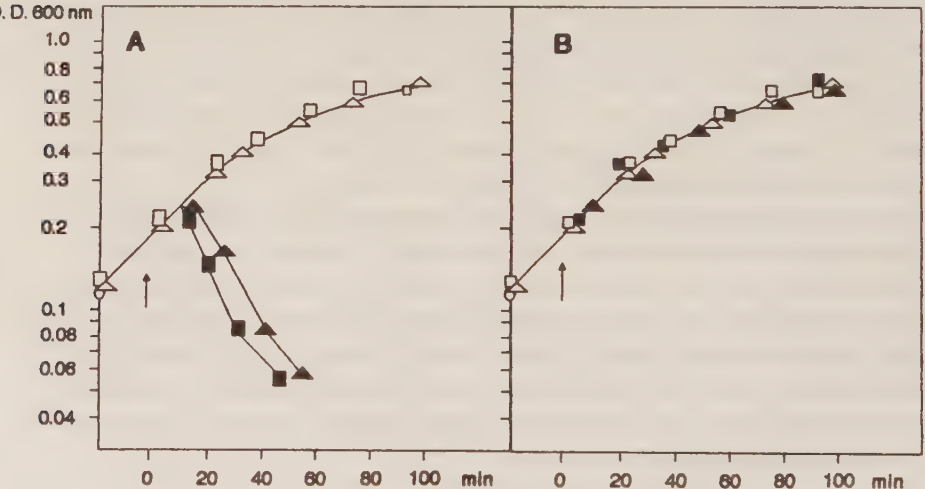


Fig.15. Expression von Gen D und E vom Plasmid pSB35 in *E. coli* pxi⁺ und pxiA

A. *E. coli* JF448(pcl857pSB12) pxi⁺ (□) und JF448(pcl857pSB35) pxi⁺ (Δ) wurden in Vollmedium bei 28⁰C bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,2 angezogen. Die Kultur wurde geteilt und in JF448(pcl857pSB12) (■) sowie JF448(pcl857pSB35) (▲) die Genexpression durch Temperaturerhöhung auf 42⁰C (Pfeil) induziert.

B. *E. coli* GH56(pcl857pSB12) pxiA (□) und GH56(pcl857pSB35) (Δ) pxiA wurden in Vollmedium bei 28⁰C bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,2 angezogen. Die Kultur wurde geteilt und in GH56(pcl857pSB12) (■) sowie GH56(pcl857pSB35) (▲) die Genexpression durch Temperaturerhöhung auf 42⁰C (Pfeil) induziert. Der Wachstumsverlauf wurde photometrisch verfolgt.

2.1. Wachstum von *E. coli* *pxl*⁺ und *pxlA* nach Expression der Gene D und E von Plasmid pSB35

Das Wachstumsverhalten von *E. coli* GH56(pcl857pSB35) *pxlA*, GH56(pcl857pSB12) *pxlA* und JF448(pcl857pSB35) *pxl*⁺ sowie JF448(pcl857pSB12) *pxl*⁺ nach Induktion der Expression der Gene D und E wurde untersucht (Fig. 15).

Der Zeitpunkt des Lyseeintritts (15 min nach Genexpression) sowie der Lyseverlauf nach Induktion der Gen E Expression in *E. coli* JF448(pcl857pSB12) war gleich dem Verhalten von JF448(pcl857pSB35) nach gemeinsamer Expression von Gen D und Gen E (Fig. 15A). Die kritische Menge an Protein E, die zur Zellyse notwendig ist, wurde von beiden Plasmiden mit gleicher Effektivität gebildet.

Erwartungsgemäß lysierte die *pxlA* Mutanten GH56 weder nach Expression von Gen E in *E. coli* GH56(pcl857pSB12) noch nach GenD/E Expression in GH56(pcl857pSB35) (Fig. 15B).

2.2. Nachweis der plasmidkodierten Proteine von Plasmid pSB12 und pSB35 in *E. coli* *pxl*⁺ und *pxlA*

Von Plasmid pSB12 ist die Synthese mehrerer Genprodukte unter der Kontrolle von Lambda P_L möglich: Protein E (10kd) und Protein J (5 kd). Das unter der Kontrolle von Lambda P_L in Plasmid pSB35 klonierte PhIX174-Fragment (Bläsi 1987) trägt 3 Intakte Gene: D, E und J.

Zur Identifizierung der plasmidkodierten Proteine D und E vom Plasmid pSB35 und Protein E vom Plasmid pSB12 wurden *pxlA* GH56, GH56(pSB12), GH56(pSB35), GH56(pcl857pSB12), GH56(pcl857pSB35), und *pxl*⁺ JF448(pcl857pSB12), JF448(pcl857pSB35) bei 28°C in Minimalmedium bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,5 angezogen. Von jeder Kultur wurden 100 µl entnommen und zur Expression der unter Lambda P_L stehenden Gene bei 42°C für 4 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42°C 20 min mit 10µCi ³⁵S-Methionin markiert. Analog wurden Zellen bei 28°C markiert. Nach Fällung der Proteine mit 10% eiskaltem TCA, Resuspension des Pellets in Laemmli-Probenpuffer erfolgte die Analyse der exprimierten Proteine mittels 14%-20% SDS-PAGE (Fig. 16).

Unter induzierten Bedingungen (42°C) konnte die Protein E-Bande von 10 kD im Proteinmuster von JF448(pcl857pSB12) (Fig. 16, Spur 2) und von JF448(pcl857pSB35) (Spur 4) gegenüber der nicht-induzierten Kontrolle (Spur 1 und 3) nachgewiesen werden. In *pxlA* GH56(pcl857pSB12) (Spur 7) und GH56(pcl857pSB35) (Spur 10) war diese Bande ebenfalls nachweisbar, obwohl sie mit schwächerer Intensität auftrat.

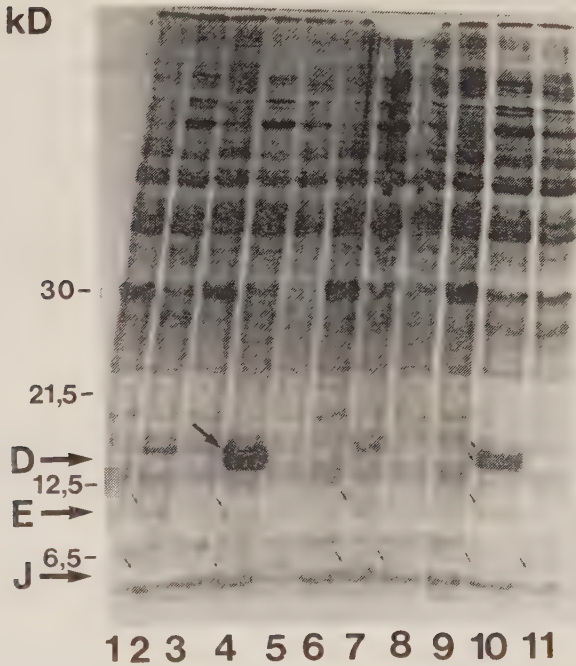


Fig.16 **Synthese von Protein E und Protein D in *E.coli* pxl^+ und $pxlA$**

Autoradiogramm des Proteinmusters von *E. coli* pxl^+ JF448(*pcI857pSB12*), JF448(*pcI857pSB35*) und *E. coli* $pxlA$ GH56(*pcI857pSB12*), GH56(*pcI857pSB35*), GH56(*pSB12*), GH56(*pSB35*).

Spur 1:	JF448(<i>pcI857pSB12</i>)	28 ⁰ C
Spur 2:	JF448(<i>pcI857pSB12</i>)	42 ⁰ C
Spur 3:	JF448(<i>pcI857pSB35</i>)	28 ⁰ C
Spur 4:	JF448(<i>pcI857pSB35</i>)	42 ⁰ C
Spur 5:	GH56	42 ⁰ C
Spur 6:	GH56(<i>pcI857pSB12</i>)	28 ⁰ C
Spur 7:	GH56(<i>pcI857pSB12</i>)	42 ⁰ C
Spur 8:	GH56(<i>pSB12</i>)	42 ⁰ C
Spur 9:	GH56(<i>pcI857pSB35</i>)	28 ⁰ C
Spur 10:	GH56(<i>pcI857pSB35</i>)	42 ⁰ C
Spur 11:	GH56(<i>pSB35</i>)	42 ⁰ C

Das Molekulargewicht (kD) der Proteinmarker, sowie die Position von Protein E (E), Protein D (D), Protein D-Fragment (D') und Protein J (J) sind gekennzeichnet.

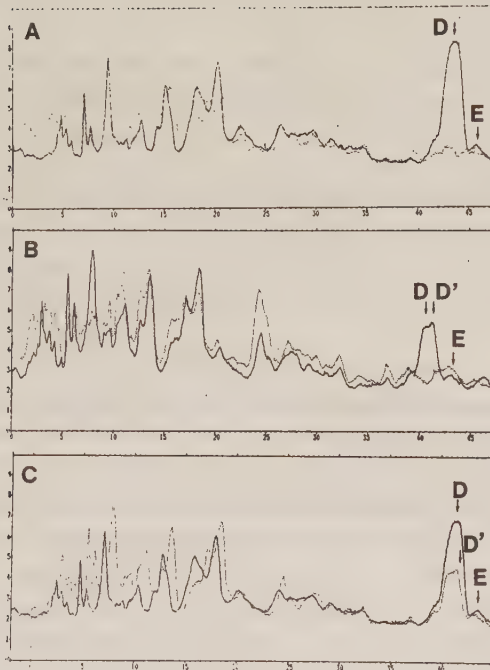


Fig.17 Quantifizierung von Protein D und Protein E im Proteinmuster von *E. coli* *pxl*⁺ und *pxlA*

Einzelne Spuren des Autoradiogramms (Fig.16) wurden densitometrisch analysiert.

- A:** Scan der Proteinmuster von *pxl*⁺ JF448(*pcI857pSB35*) 28⁰C (.....) und 42⁰C (-----).
B: Scan der Proteinmuster von *pxlA* GH56(*pcI857pSB35*) 28⁰C (.....) und 42⁰C (-----).
C: Scan der Proteinmuster von JF448(*pcI857pSB35*) 42⁰C (-----) und GH56(*pcI857pSB35*) 42⁰C (.....).

Die Position von Protein E (E), Protein D (D) und des Protein D-Fragments (D') sind gekennzeichnet

Protein D konnte bei kontrollierter Expression unter induzierten Bedingungen als Hauptproteinbande im Gesamtproteinmuster von JF448(pcl857pSB35) (*Spur 4*) mit einem Molekulargewicht von 16 kD identifiziert werden. Die Expression des Gen D Produkts in GH56(pcl857pSB35) (*Spur 10*) war jedoch im Vergleich zur Expression in JF448(pcl857pSB35) (*Spur 4*) reduziert. Auch waren zwei Proteinbanden erkennbar, deren Molekulargewicht sich geringfügig unterschied. Das Molekulargewicht des kleineren Proteins (Protein D') wurde mit 15,5 kD bestimmt.

Eine Protein J Bande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 5 kD wurde ebenfalls in *E. coli* GH56(pcl857pSB12) (*Spur 7*), GH56(pSB12) (*Spur 8*), GH56(pcl857pSB35) (*Spur 10*) und GH56(pSB35) (*Spur 11*) identifiziert. Im Proteinmuster von *E. coli* JF448(pcl857pSB12) und JF448(pcl857pSB35) war an dieser Position jedoch nur eine schwache Proteinbande erkennbar.

In *pxlA* Mutanten GH56(pSB12) (*Spur 8*) und GH56(pSB35) (*Spur 11*), die konstitutiv Protein D (pSB35) und Protein E (pSB35, pSB12) exprimieren, konnte weder Protein D noch Protein E nachgewiesen werden. Die ständige Expression der Gene D und E führte damit möglicherweise zum erhöhten Abbau beider Genprodukte.

2.3. Quantifizierung der Proteine D und E nach Expression vom Plasmid pSB35 in *E. coli pxi⁺* und *pxlA*

Durch densitometrische Quantifizierung wurden die vom Plasmid pSB12 und pSB35 synthetisierten Proteinmengen von Protein D und Protein E ermittelt (*Fig.17*). Die unter induzierten Bedingungen exprimierte Protein D-Menge in JF448(pcl857pSB35) betrug ungefähr 21,7% des markierten Gesamtproteins (*Fig.17A*). In GH56(pcl857pSB35) wurde für die Protein D-Synthese ein Wert von 10,2% ermittelt (*Fig.17B*), der sich zu gleichen Teilen (je 5,1%) aus intaktem Protein D und dem Protein D'-Fragment zusammensetzte. Der Gehalt an intaktem Protein D belief sich damit in den *pxlA* Mutantenklonen auf nur 25% der in lysepositiven *pxl⁺*-Zellen synthetisierten Menge.

Die in *pxl⁺* JF448(pcl857pSB12) und JF448(pcl857pSB35) bei 42°C gebildete Menge an Protein E wurde mit 2,6 % des markierten Gesamtproteins ermittelt. Geht man von den Daten aus, die durch Protein D-Quantifizierung erhalten wurden, so ist die Synthese von intaktem Protein E in den *pxlA* Mutanten GH56(pcl857pSB12) ebenfalls um 75% auf 0,7% des Gesamtproteins reduziert. Die Erniedrigung der Protein E-Konzentration in *pxlA* Mutanten konnte somit eine mögliche Erklärung für die phänotypische Resistenz gegen das klonierte Gen E Produkt sein.

Die Gene E und J (pSB12) und die Gene D, E und J (pSB35) stehen in den Plasmiden unter der Kontrolle von Lambda P_L und werden somit gleich stark transkribiert. Die Herabsetzung der Synthese von Protein D und E und die Bildung eines verkürzten D'-Proteins war möglicherweise auf eine

zelluläre Aktivität zurück zuführen, die auf das Lambda P_L -Transkript direkten und/oder indirekten Einfluß hatte. Ausgehend von diesen Befunden wurden Analysen der nach Induktion der Genexpression von Plasmid pSB35 synthetisierten Transkripte in pxl^+ -Wildtypzellen und $pxlA$ Mutanten durchgeführt.

3. Transkriptanalysen der Lambda P_L -spezifischen mRNA von Plasmid pSB35 in *E. coli* pxl^+ und $pxlA$

3.1. Kinetik der Lambda $P_{L-GenD/E}$ -spezifischen mRNA von Plasmid pSB35 in *E. coli* pxl^+ und $pxlA$

3.1.1. Nachweis der $P_{L-GenD/E}$ -spezifischen mRNA in *E. coli* pxl^+

Von Lambda P_L ausgehend ist von Plasmid pSB35 die Synthese eines 761b langen Transkripts möglich, das am Φ X174-spezifischen Terminator T_J beendet wird (Fig. 18)

Der Nachweis des 761b Transkripts, das von Lambda P_L aus synthetisiert wird und sowohl die kodierenden Sequenzen für die Protein D- als auch Protein E-Synthese beinhaltet, erfolgte über Northernanalyse (Fig. 19) durch Hybridisierung mit einer Gen E-spezifischen DNA-Probe, die die Sequenzen von Nukleotid 572-968 des Φ X174 Genoms umfaßte (Fig. 18).

Sechs Minuten nach Induktion konnte die von Lambda P_L transkribierte mRNA ($P_{L-GenD/E}$) mit einer Länge von 761b nachgewiesen werden (Fig. 19, Spur 3). Die Intensitätszunahme dieser hybridisierten Bande im Autoradiogramm in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Temperaturerhöhung ließ auf ständige Transkription dieser mRNA schließen. Gleichzeitig trat ein weiteres Transkript mit einer ungefähren Länge von 220b 9 min nach Induktion auf. Während der Versuchszeit von 20 min nahm die synthetisierte mRNA-Menge beider Transkriptgrößen ständig zu. Zu den Zeitpunkten $t = 9, 12, 15$ und 20 min nach Temperaturerhöhung (Spur 4-7) wurden drei weitere distinkte Banden, die jedoch durch erhöhten Background, nur schwach sichtbar waren, im Autoradiogramm nachgewiesen. Die Bestimmung der Transkriptlängen ergab Größen von 600b, 340b und 300b für die verschiedenen mRNA-Fragmente (Fig. 19; Spur 6 und 7).

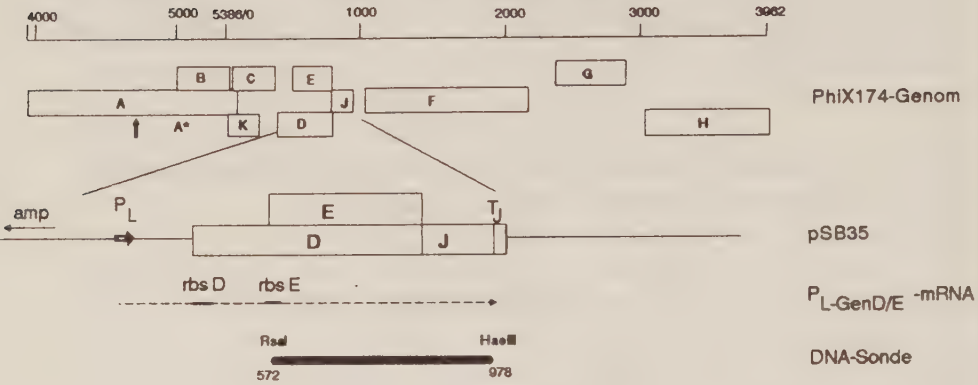


Fig.18 PhiX174-spezifische DNA-Sequenzen als Hybridisierungsprobe

Das PhiX174-Genom mit Anordnung der Gene ist im oberen Teil dargestellt; der in Plasmid pSB35 klonierte Bereich ist vergrößert dargestellt. Das Plasmid pSB35 und die von Lambda P_L transkribierte mRNA sind ebenso wie die PhiX174-spezifische DNA-Sonde (vom Nukleotid 572-978 des PhiX174-Genoms nach der Karte von Sanger et al., 1978) angegeben.

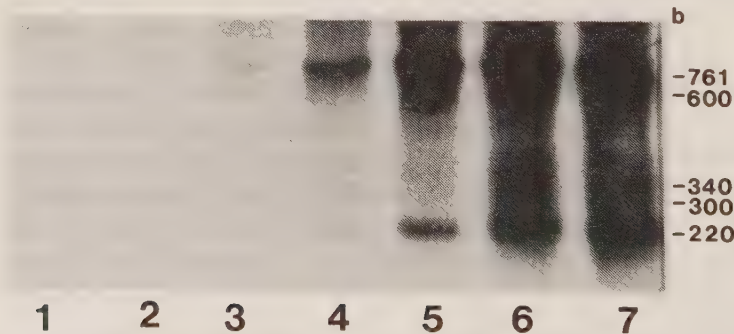


Fig.19 Northernblotanalysen der P_L-GenD/E-mRNA in *E. coli* pxi⁺

E. coli JF448(pcl857pSB35) pxi⁺ wurde bei 28°C bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,8 angezogen und die P_L-spezifische Transkription durch Temperaturerhöhung auf 42°C induziert. Zu den Zeitpunkten t = 0 (Spur 1), 3 (Spur 2), 6 (Spur 3), 9 (Spur 4), 12 (Spur 5), 15 (Spur 6) und 20 min (Spur 7) nach Temperaturerhöhung wurden je 5 ml Proben entnommen. Gesamt-RNA isoliert und eine Northernblotanalyse mit einer ³²P-markierten DNA-Sonde (Fig.18) durchgeführt. Die Größen der mRNAs wurden über die 23S, 16S und 5S rRNA als Längenstandard bestimmt.

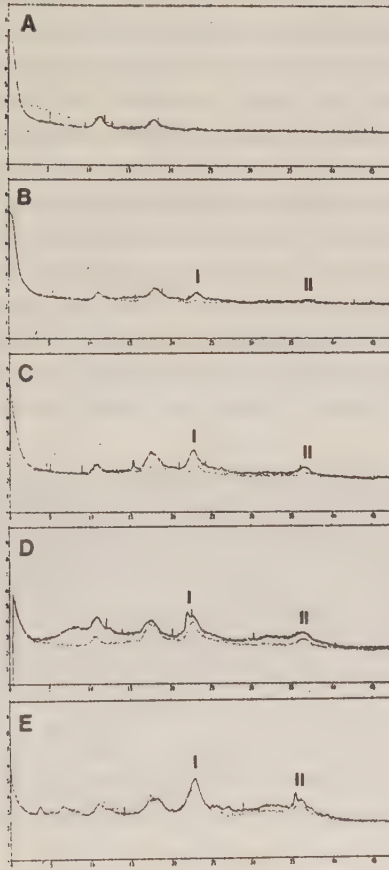


Fig.20 Quantifizierung P1-GenD/E-spezifischer mRNA nach Induktion der Transkription vom Plasmid pSB35 in *E. coli* JF448(pcl857pSB35) pxi⁺.

Die Spuren 2-7 des Autoradiogramms in Fig.19 wurden densitometrisch analysiert. Die Densitogramme einzelner, gescannter Spuren wurden übereinander projiziert (A-E) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einsetzen der Transkription die mRNA verglichen

- A: Spur 2 (....) und Spur 3 (----)
- B: Spur 3 (....) und Spur 4 (----)
- C: Spur 4 (....) und Spur 5 (----)
- D: Spur 5 (....) und Spur 6 (----)
- E: Spur 6 (....) und Spur 7 (----)

Die Positionen des intakten Transkripts von 761b (I) und der 220b (II)-mRNA sind gekennzeichnet.

Die aufgetretenen Transkripte von 761b und 220b zeigten im Autoradiogramm sehr definierte Bandengrößen. Beide mRNAs traten nach Temperaturerhöhung auf und konnten damit nur vom Lambda P_L (und nicht von einem möglichen internen Promotor) transkribiert worden sein. Der extrem hohe Gehalt der 220b-mRNA läßt sich jedoch nur durch eine Prozessierung des intakten Transkripts (761b) und einen sehr raschen Abbau des resultierenden mRNA-Fragments erklären, da kein zusätzliches Prozessierungsprodukt in solch hoher intrazellulärer Konzentration nachgewiesen werden konnte. Der relativ hohe Gehalt des 761b- und 220b-Transkripts ist daher möglicherweise auf eine erhöhte "Resistenz" dieser mRNAs gegen 3'-5'-Exonukleasenangriff zurückzuführen. Für die PhIX174-GenD/E-mRNA Klasse XIII (Fig. 29A), die sich nur in einigen Sequenzen im 5'-Bereich von der P_L-GenD/E-mRNA unterscheidet, ist bekannt, daß sie im 3'-Bereich des Transkripts eine stem-loop-Struktur besitzt, die die Funktion eines Transkriptionsterminationssignals hat und für die Stabilität dieses Transkripts verantwortlich ist (Hayashi et al., 1976). Es muß daher gefordert werden, daß das 220b mRNA-Fragment aufgrund seiner erhöhten Stabilität ebenfalls diese stem-loop-Struktur an seinem 3'Ende besitzt.

3.1.2. Nachweis der P_L-GenD/E-spezifischen mRNA in *pxlA* Mutanten von *E. coli*

Die Analyse der nach Induktion der Transkription von Lambda P_L gebildeten spezifischen mRNA erfolgte in GH56(pcl857pSB35) *pxlA* ebenfalls wie für JF448(pcl857pSB35) durch Northernanalyse (Fig. 21). Die Hybridisierungsprobe umfaßte die Sequenzen von Nukleotid 572-968 des PhIX174 Genoms (Fig. 18).

6 min nach Induktion der Transkription war Intakte P_L-GenD/E-mRNA (761b), die mit der Gen E spezifischen DNA-Probe (Fig. 18) hybridisierte, nachweisbar (Fig. 21, Spur 3). Dieses Transkript konnte auch zu späteren Zeitpunkten nach Induktion mit fast gleichbleibender Intensität gefunden werden (Spur 4-7).

In Proben, die 12 min und später nach Temperaturerhöhung entnommen worden waren (Spur 5), konnte eine weitere Bande identifiziert werden, deren Größe mit ungefähr 600b bestimmt wurde. Diese mRNA-Größe war in *pxl*⁺ erst 15 min nach Induktion und in wesentlich geringerer Konzentration nachweisbar gewesen (Fig. 19).

Das Auftreten dieses zusätzlichen, kürzeren Transkripts in *pxlA* konnte entweder auf einer frühzeitigen Termination oder einer Transkript-Prozessierung im 3'- oder 5'-Bereich des intakten Transkripts beruhen.

Eine 5'-Verkürzung des intakten Transkripts um 160b würde jedoch die Ribosomenbindungsstelle von Gen D deletieren und nicht zur Synthese von Protein D führen. Aus einer Deletion des 3'-Endes des Transkripts um 160b resultierte die Synthese eines C-terminal um 6 Aminosäuren verkürzten D-Proteins und 5 Aminosäuren verkürzten E-Proteins. Die Analyse des Proteinmusters von *pxl*⁺- und

pxIA-Zellen nach Expression von Gen D und E vom Plasmid pSB35 hatte gezeigt, daß neben dem Intakten Protein D ein verkürztes Protein D'-Fragment von 15,5 kD in **pxIA** Mutanten auftrat (Fig. 16). Das Auftreten und der hohe Gehalt der 600b-mRNA und eine 3'-Deletion dieser mRNA würden dafür eine hinreichende Erklärung liefern.

Ein kleines Spaltprodukt, das durch 3'- und 5'-Prozessierung der 761b mRNA zusätzlich zu dem 600b-Fragment auftreten sollte, konnte mit dieser DNA-Sonde nicht nachgewiesen werden (die Sonde mit der Sequenz von Nukleotid 572-968 überdeckte allerdings nur den 5'-Bereich des Transkripts). Eine dritte Bande mit sehr schwacher Intensität und einer Größe von 220b konnte in **pxIA** ebenso wie in **pxl**⁺ nachgewiesen werden (Spur 5-7). Die geringe Intensität dieses Transkripts resultierte möglicherweise ebenfalls aus der erhöhte Nukleaseaktivität in **pxIA**.

Zur genaueren Bestimmung des intrazellulären Gehalts der PL spezifischen mRNAs in **pxl**⁺- und **pxIA**-Zellen erfolgte eine quantitative Analyse über densitometrische Messungen im Laserscan.

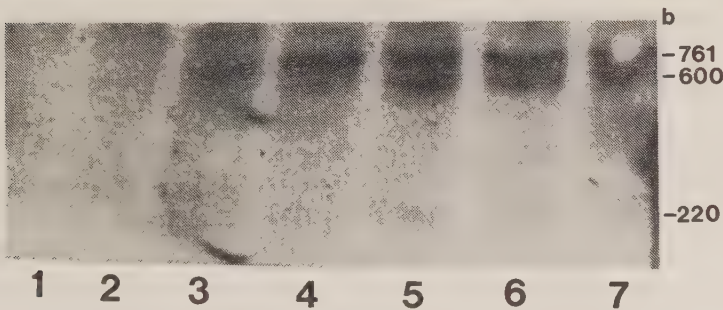


Fig.21 Northernanalyse P₁-GenD/E-mRNA vom Plasmid pSB35 in E.coli **pxlA**

E. coli GH56(pcl857pSB35) **pxlA** wurde bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,8 bei 28⁰C angezogen und die P₁-spezifische Transkription durch Temperaturerhöhung auf 42⁰C induziert. Zu den Zeitpunkten *t* = 0 (Spur 1), 3 (Spur 2), 6 (Spur 3), 9 (Spur 4), 12 (Spur 5), 15 (Spur 6) und 20 min (Spur 7) nach Temperaturerhöhung wurde Gesamt-RNA isoliert und eine Northernanalyse gegen eine ³²-P markierte DNA-Probe (Fig.18) durchgeführt.

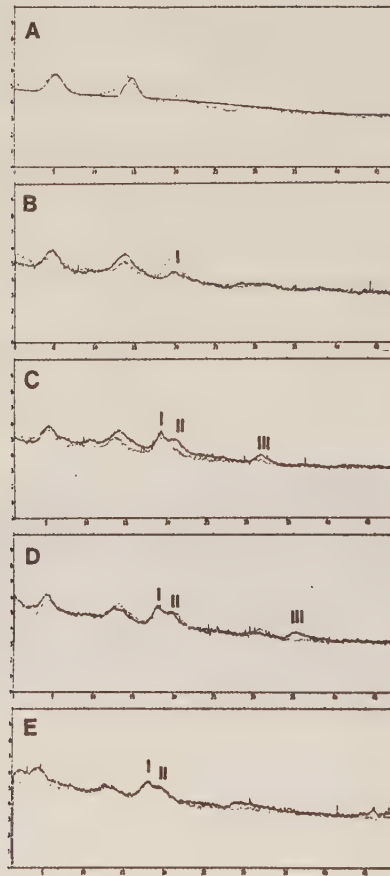


Fig.22 Quantifizierung $P_{L-Gen D/E}$ -spezifischer mRNA nach Induktion der Transkription vom Plasmid pSB35 in *E. coli* GH56(pcl₈₅₇pSB35) *pxlA*.

Die Spuren 2-7 des Autoradiogramms in Fig.21 wurden densitometrisch analysiert. Die Densitogramme einzelner, gescannter Spuren wurden übereinander projiziert (A-E) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einsetzen der Transkription die mRNA verglichen.

- A: Spur 2 (....) und Spur 3 (---)
- B: Spur 3 (....) und Spur 4 (---)
- C: Spur 4 (....) und Spur 5 (---)
- D: Spur 5 (....) und Spur 6 (---)
- E: Spur 6 (....) und Spur 7 (---)

Die Position der intakten mRNA von 761b (I), der 600b-mRNA (II) und der 220b-mRNA (III) ist gekennzeichnet.

3.2. Quantifizierung der $P_{L-GenD/E}$ -spezifischen mRNA in *E. coli pxi⁺* und *pxiA*

3.2.1. Quantifizierung der Lambda $P_{L-GenD/E}$ -mRNA in *E. coli pxi⁺*

Durch densitometrische Messung im Laserscan des Autoradiogramms der Northernanalyse (Fig. 19) wurden die Intensitätsprofile der einzelnen Spuren aufgestellt (Fig. 20). Die Auswertung der Intensitätsdaten ist in Tab. 9 zusammengefaßt.

Das Ansteigen des intrazellulären Gehalts $P_{L-GenD/E}$ -spezifischer mRNA konnte durch Zunahme der Gesamtintensität im Densitogramm verfolgt werden. Die 20 min nach Induktion der Transkription maximal erreichte Intensität wurde mit 100% festgelegt (Tab. 9). Die Zunahme der Gesamtintensität erfolgte zunächst mit sehr hoher Rate. 9 min nach Induktion konnte eine Zunahme der mRNA um das 12fache des 6min-Werts festgestellt werden. Nach 12 min erhöhte sich der Gehalt nur noch um das 4fache, nach 15 min um das 3fache und nach 20 min konnte nur das 1,2fache der vorhergehenden Intensität ermittelt werden. Da gleiche Gesamt-RNA-Mengen für die Northernblotanalyse aufgetragen worden waren, konnte davon ausgegangen werden, daß die Synthese der von Lambda P_L synthetisierten spezifischen mRNA 20 min nach Induktion und fast gleichzeitig mit dem Einsetzen der Lyse (20 min nach Induktion bei O.D.₆₀₀ 0,8) ihren maximalen Wert erreicht hatte. Vergleiche der aufgetretenen Transkripte und Transkriptfragmente (Tab. 9, Spalte 2-4) ergaben eine ständige Intensitätszunahme der aufgetretenen mRNA-Spezies von 761b (Spalte 2) und 220b-mRNA (Spalte 4). Durch Vergleich der prozentualen Verteilung der aufgetretenen mRNA oder mRNA-Fragmente an der Gesamtintensität wurde eine Verschiebung zugunsten kürzerer Transkripte (Spalte 3) festgestellt, die schon vor Eintritt der optisch sichtbaren Lyse eintrat. Die Intensität des 761b langen Transkripts nahm zwar ebenso wie die der anderen Transkripte ständig zu, der prozentuale Anteil des längsten Transkripts sank jedoch bis zum Zeitpunkt der Lyse. Dagegen stieg der Anteil der Zwischenfragmente mit Längen zwischen 600b, 340b, und 300b (Spalte 3). Die Darstellung der ermittelten Intensitätsdaten in den Histogrammen (Fig. 23) verdeutlicht die Verschiebung des Gehalts der mRNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Induktion.

Tab.9 Zeitliches Auftreten und prozentuale Verteilung P_L -GenD/E-mRNA in *E. coli* JF448(pcl857pSB35) *pxl*⁺.

Zeitpunkt min	Totalintensität		Intensität 761b mRNA		Intensität Zwischen- fragmente		Intensität 220b mRNA	
	*1.000	%	*1.000	%	*1.000	%	*1.000	%
0	0							
3	0							
6	5	100	5,0	100				
9	60	100	55,7	92,9			4	7,1
12	246	100	200,0	81,3	6	2,4	40	16,2
15	594	100	434,0	73,6	40	10,0	120	20,2
20	763	100	550,0	72	50	11,0	163	21,4
Spalte	1		2		3		4	

Die einzelnen Spuren des Autoradiogramms der Northernblotanalyse (Fig.19) wurden im Laserdensitometer gescannt (Fig.20). Die Quantifizierung der P_L -spezifischen Gen D/E-mRNA erfolgte durch Integration der Fläche unterhalb des Peaks I (761b mRNA), II (220b mRNA) und des Bereichs zwischen beiden Peaks (Zwischenfragmente). Die relativen Intensitätsdaten (*1.000) wurden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Genexpression (0-20 min) zusammengestellt. Die prozentuale Verteilung der mRNAs wurde berechnet, wobei die Totalintensität zum jeweils angezeigten Zeitpunkt gleich 100% gesetzt wurde. Die Totalintensität gibt die Summe der ermittelten Intensitäten der verschiedenen mRNAs an. Mit "Zwischenfragmente" wurde der Bereich des Autoradiogramms bezeichnet, in dem keine Auflösung von diskreten mRNA-Banden möglich war.

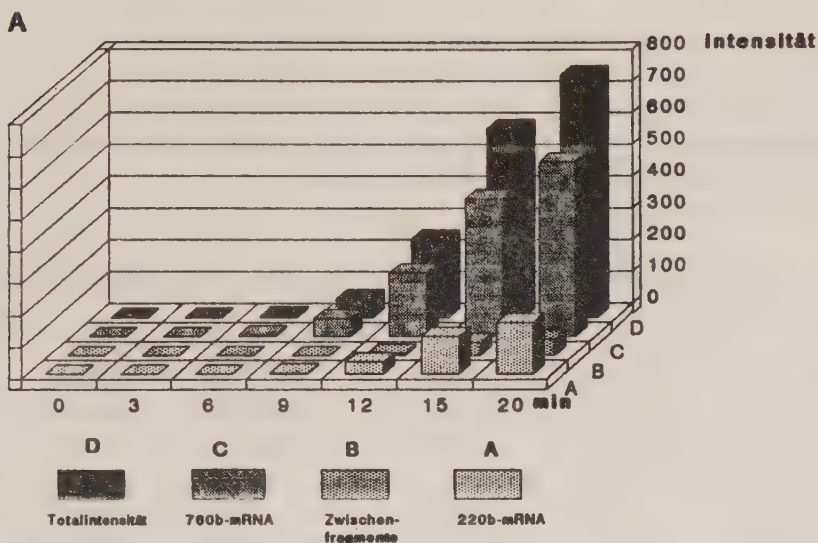
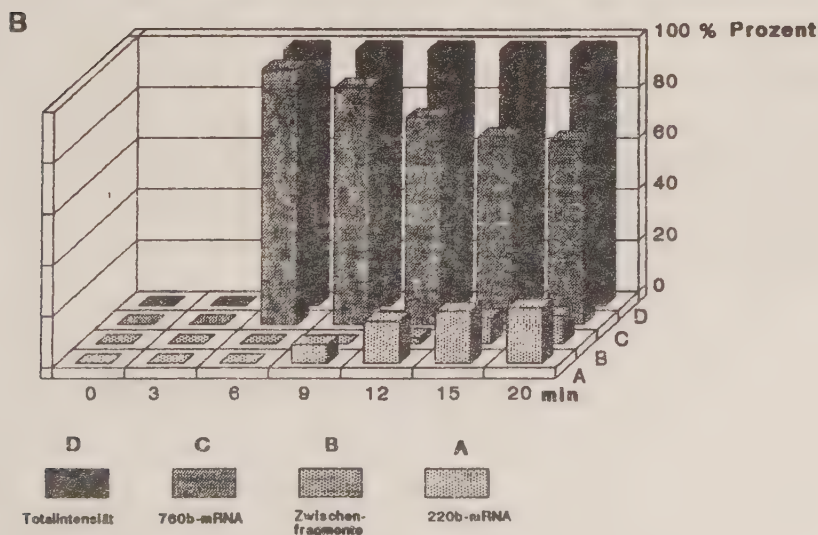


Fig.23 Änderung des intrazellulären Gehalts von $P_{L-GenD/E}$ -mRNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Induktion in *E. coli* pxl^+

- A:** Histogramm der Intensitätsverteilung $P_{L-GenD/E}$ -spezifischer mRNA in pxl^+ JF448(*clg57pSB35*).
B: Histogramm der prozentualen Verteilung $P_{L-GenD/E}$ -spezifischer mRNA in pxl^+ JF448(*clg57pSB35*).



3.2.2. Quantifizierung der Lambda P_L-GenD/E-mRNA in *E. coli* *pxlA* Mutanten

Durch densitometrische Auswertung (Fig.21) des Autoradiogramms der Northernblotanalyse (Fig.22) und Intensitätsvergleich der P_L-GenD/E-spezifischer mRNA in *pxlA* GH56(*pci*857*psb*35) wurden der Gehalt und die prozentuale Verteilung der mRNAs bestimmt (Tab.10).

Tab.10 Zeitliches Auftreten und prozentuale Verteilung P_L-GenD/E-mRNA in *E. coli* GH56(*pci*857*psb*35)

Zeitpunkt min	Totalintensität		Intensität 761b mRNA		Intensität 600b mRNA		Intensität 220b mRNA	
	*1.000	%	*1.000	%	*1.000	%	*1.000	%
0	0							
3	0							
6	101	100	101	100				
9	188	100	165	88	21	11,0	1,8	1,0
12	350	100	185	51	147	42,0	25,0	7,1
15	411	100	205	50	178	43,3	26,0	6,3
20	433	100	229	55	173	40,0	27,0	6,2
Spalte	1		2		3		4	

Die einzelnen Spuren des Autoradiogramms der Northernanalyse (Fig.21) wurden im Laserdensitometer gescannt (Fig.22). Die Quantifizierung der P_L-spezifischen Gen D/E-mRNA erfolgte durch Integration der Fläche unterhalb des Peaks I (761b mRNA), II (600b mRNA) und III (220b mRNA). Die relativen Intensitätsdaten (*1.000) wurden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Genexpression (0-20 min) zusammengestellt. Die prozentuale Verteilung der mRNAs wurde berechnet, wobei die Totalintensität zum jeweils angegebenen Zeitpunkt gleich 100% gesetzt wurde. Die Totalintensität gibt die Summe der ermittelten Intensitäten der verschiedenen mRNAs an.

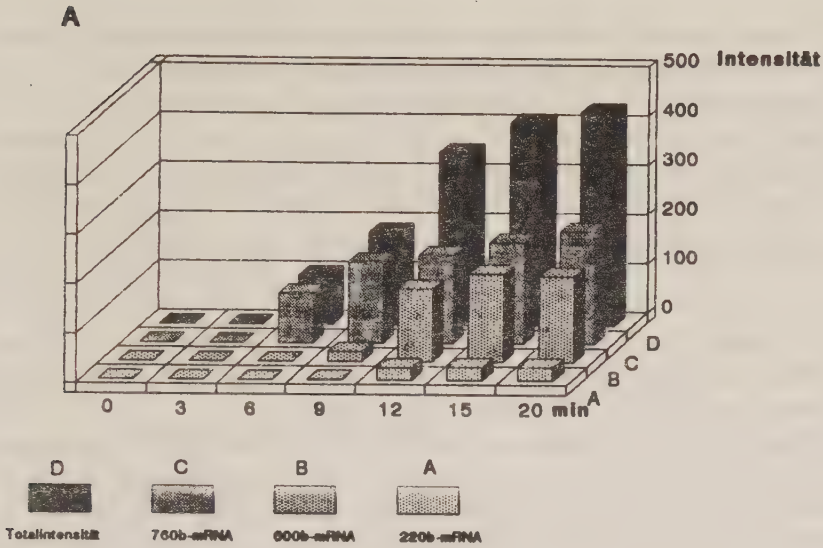
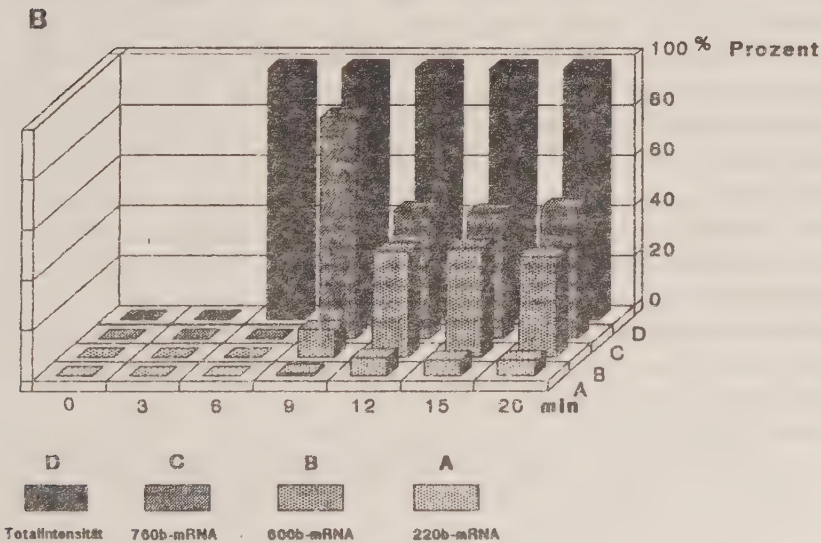


Fig.24 Änderung des intrazellulären Gehalts von $P_{L\text{-GenD/E}}$ -mRNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Induktion in *E.coli pxLA*

- A: Histogramm der Intensitätsverteilung $P_{L\text{-GenD/E}}$ -spezifischer mRNA in *pxLA GH56(cI₈₅₇pSB35)*
 B: Histogramm der prozentualen Verteilung $P_{L\text{-GenD/E}}$ -spezifischer mRNA in *pxLA GH56(pcl₈₅₇pSB35)*



Die Intensitätsverteilung der von Lambda P_L nach Induktion transkribierten spezifischen mRNA zeigte, daß ständige Intensitätszunahme erfolgte, deren gemessener Maximalwert bei 20 min nach Induktion der Genexpression lag. Die höchste Steigerung des intrazellulären Gehalts konnte zwischen 3 und 12 min nach Temperaturerhöhung beobachtet werden. In dieser Zeit wurden 80% der maximal synthetisierten mRNA nachgewiesen. Das 761b lange Transkript stellte bis 9 min nach Induktion den Hauptanteil der hybridisierten mRNA dar (Tab.10, Spalte 2). Mit zeitlicher Verzögerung erfolgte auch die Intensitätszunahme des 600b langen mRNA-Fragments. Der prozentuale Anteil dieser mRNA-Spezies stieg von 11% auf 43% der Insgesamt synthetisierten mRNA (Spur 3), während der des Intakten Transkripts von 88% auf 55% sank. Damit wurde 20 min nach Induktion der Gehalt an intaktem Transkript (55%) zu dem 600b mRNA-Fragment (43%) verschoben. Die Änderung der intrazellulären Verteilung des Gehalts der P_L-GenD/E-spezifischen mRNA in *E. coli* **pxIA** in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Transkriptionsinduktion wird in Fig. 24 verdeutlicht.

Diese Daten stehen auch in Übereinstimmung mit der Analyse und Quantifizierung der von Plasmid pSB35 nach Induktion gebildeten Menge von Protein D und einem Protein D'-Fragment, die in **pxIA** Mutanten 20 min nach Genexpression eine relative Verteilung von 1:1 aufzeigten. Gleichzeitig war der Gesamtgehalt beider Proteine in **pxIA** Mutanten (10,2%) im Vergleich zu Protein D in Wildtypzellen (21,6%) um 50% reduziert.

Die kürzeste nachweisbare mRNA-Klasse mit 220b Länge erreichte mit 7% 12 min nach Induktion ihren höchsten gemessenen Wert. Der Gesamtgehalt der identifizierten mRNA-Klassen blieb ab 12 min nach Induktion in **pxIA** Mutanten fast konstant.

Es mußte daher davon ausgegangen werden, daß in **pxIA** Zellen die Lambda P_L-GenD/E-spezifische mRNA, die wie in **pxI**⁺-Zellen ständig neu synthetisiert wird, vermehrt gespalten oder frühzeitig terminiert wird, wodurch es zu einer Intensitätszunahme des verkürzten 600b mRNA-Fragments kam.

Eine frühzeitige Termination der Transkription in **pxIA** Mutanten beträfe jede von Lambda P_L aus transkribierte GenD/E mRNA falls die Termination stringent wäre. Der relativ hohe Gehalt an intaktem Transkript in **pxIA** Mutanten und das zeitlich verzögerte Auftreten der kürzeren mRNA-Spezies lassen sich damit nur ungenügend erklären.

Durch die Identifizierung einer diskreten Bande des verkürzten Transkripts von 600b in **pxIA** Mutanten ist eher anzunehmen, daß eine spezifische endonukleolytische Spaltung innerhalb der mRNA erfolgt, die zu einer Reduktion an intaktem Protein D und E und einer C-terminalen Verkürzung führt.

Ständige Synthese von P_L-GenE-mRNA und P_L-GenD/E-mRNA, wie sie in *E. coli* **pxIA** GH56(pSB12) und GH56(pSB35) möglich ist, müßte somit zu einem raschen Abbau dieser mRNA führen. Unter solchen Bedingungen konnten weder Gen D- und E-spezifische mRNA (Daten nicht gezeigt) noch Protein D und E nachgewiesen werden (Fig.16).

4. Identifizierung der verschiedenen mRNAs in *E. coli* pxl^+ und $pxlA$ durch Hybridisierung mit Φ X174 DNA-Fragmenten

Northernanalysen von $PL_{GenD/E}$ -spezifischer mRNA (Plasmid pSB35) hatten gezeigt, daß neben der intakten $PL_{GenD/E}$ -mRNA von 761b zusätzliche verkürzte Transkripte sowohl in *E. coli* pxl^+ - als auch in $pxlA$ -Zellen auftreten.

Durch weitere Hybridisierungsexperimente mit verschiedenen Φ X174 DNA-Sonden sollten die aufgetretenen mRNA-Spezies näher identifiziert werden.

4.1. Analyse der mRNA-Klassen in *E. coli* pxl^+ nach Transkription von $PL_{GenD/E}$ -mRNA vom Plasmid pSB35

E. coli pxl^+ JF448(cl_{857} pSB35) wurde in Vollmedium bis zur O.D.₆₀₀ 0,8 angezogen, die Transkription durch Temperaturerhöhung induziert und nach 15 min Gesamt-RNA isoliert. Je 5 RNA-Proben wurden auf einem denaturierenden Harnstoff-Agarosegel aufgetrennt, und die RNA anschließend auf Gene-Screen-Plus Membranfilter gebロットet. Der Filter wurde in Streifen geschnitten und die Streifen parallel gegen 5 DNA-Sonden hybridisiert. Das Autoradiogramm der Northernanalyse von $PL_{GenD/E}$ -spezifischer mRNA in *E. coli* pxl^+ ist in Fig.26 gezeigt. Die DNA-Proben (Φ X174-Genom von Nukleotid 445-1452) überspannten verschiedene Segmente der Φ X174 GenD/E-Sequenz. Die DNA-Hybridisierungsproben sind mit ihren Koordinaten auf der Φ X174-Sequenz in Fig.25 wiedergegeben.

Nach Hybridisierung (Fig.26) zeigte $PL_{GenD/E}$ -mRNA aus pxl^+ JF448(cl_{857} pSB35)-Zellen distinkte Banden von 761b, 600b, 420b, 340 und 220b, deren Intensität sich untereinander jedoch wesentlich unterschied. Das intakte Transkript von 761b konnte im Autoradiogramm mit Hybridisierungsprobe 1, 2, 3, 4, und 5 neben kürzeren Transkriptfragmenten mit schwächerer Intensität als prominente Bande identifiziert werden.

Die verkürzten mRNA-Spezies könnten, wie schon erwähnt, 5'- oder 3'-terminale Prozessierungsprodukte des 761b Transkripts sein oder aus frühzeitiger Termination im 3'-Bereich der mRNA resultieren. Falls die verkürzten mRNAs durch unterschiedliche Terminationsstellen entstanden waren, sollten DNA-Proben mit 5'-terminalen Gen E-Sequenzen hybridisieren; DNA-Proben, die jedoch nur 3'-terminale Sequenzen überdeckten, sollten kein Signal ergeben.

Das Autoradiogramm der Northernanalysen mit einem 234b *Hae*III-Fragment als DNA-Probe 1 (Φ X174-Genom:434-668) zeigte ein starkes Signal bei 761b und schwächere bei 600b und 420b (Fig.26, Spur 1).

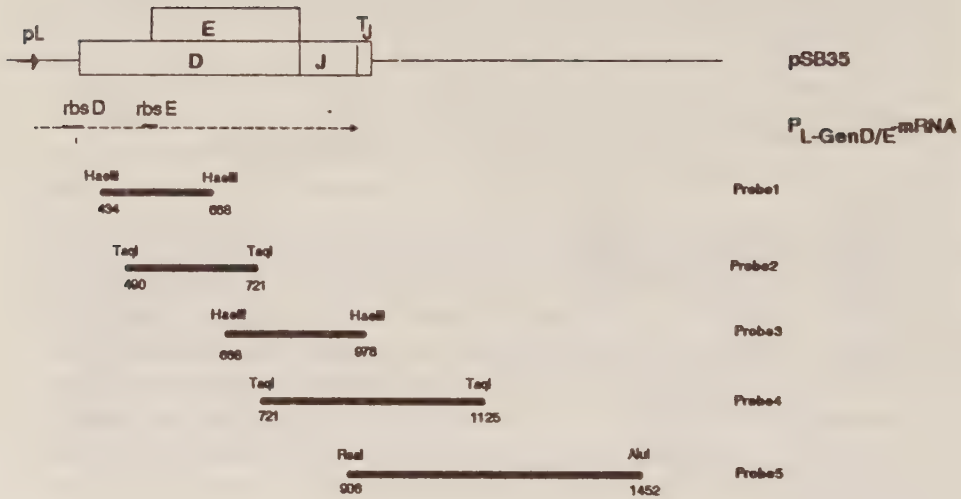


Fig.25 PhiX174-spezifische DNA-Segmente als Hybridisierungs sonden

Die Genkarte von PhiX174 und der in Plasmid pSB35 klonierte Bereich ist dargestellt. Die Restriktionsfragmente, die als Hybridisierungs sonden in den Northernanalysen eingesetzt wurden, sind mit ihren Restriktionsstellen und den entsprechenden Koordinaten auf dem PhiX174 Genom nach Sanger et al. (1978) angegeben.

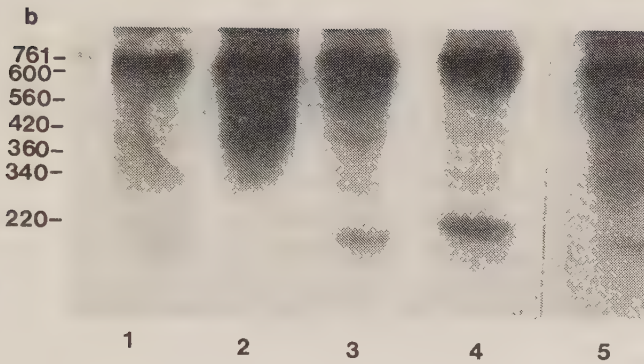


Fig.26 Autoradiogramm der Northernanalyse von $P_{L-GenD/E}$ -mRNA aus *E. coli* pxd^+ JF448($pcl_{857pSB35}$)

- Spur 1: Hybridisierung mit DNA-Sonde 1
 Spur 2: Hybridisierung mit DNA-Sonde 2
 Spur 3: Hybridisierung mit DNA-Sonde 3
 Spur 4: Hybridisierung mit DNA-Sonde 4
 Spur 5: Hybridisierung mit DNA-Sonde 5

Versuchsdurchführung siehe Text. Die Längen der mRNAs wurden mit der 23S, 16S und 5S rRNA als Größenmarker ermittelt.

Tab.11 **PLGenD/E-spezifische mRNA-Fragmente nach Hybridisierung mit PhiX174-spezifischen DNA-Sonden**

	PhiX174-spezifische Hybridisierungsproben				
	Probe 1 (434-668)	Probe 2 (490-721)	Probe 3 (668-978)	Probe 4 (721-1125)	Probe 5 (906-1452)
-	761	761	761	761	761
PLGenD/E	600	600	600	600	
mRNA				560	
Fragmente	420	420	420	420	
in (b)	340	340	340	340	
		220	220	220	

Die Nukleotidpositionen der DNA-Sonden auf der PhiX174-Sequenz sind entsprechend Fig. 25 angegeben.

Nach Hybridisierung mit DNA-Probe 2, einem 231b TaqI-Fragment (PhiX174 Genom: 490-721), wurden ebenfalls mRNAs mit Größenklassen von 761b, 600b, und 420b identifiziert; gleichzeitig trat ein schwaches Signal einer mRNA von 340b auf (*Spur 2*). Wurden für die Hybridisierung 5'-verkürzte DNA-Sonden eingesetzt, so konnten sowohl mit einem 310b HaeIII-Fragment als DNA-Probe 3 (PhiX174-Genom: 668-978) als auch einer 404b DNA-Sonde 4 (PhiX174-Genom: 721-1125) neben den 761b, 600b, 420b, und 340b langen mRNAs zusätzliche mRNA-Spezies von 560b, 360b und 220b nachgewiesen werden. Die 220b mRNA war mit fast gleicher Intensität im Autoradiogramm (*Spur 3 und 4*) aufgetreten wie das intakte Transkript von 761b.

Hybridisierung mit einer DNA-Probe 5 (PhiX174 Genom: 906-1452), die keine kodierenden Sequenzen von Gen D und E beinhaltet, führte zu einem Signal mit dem 761b Intakten Transkript (*Spur 5*). Daneben konnten mRNA-Spezies von 560b, 340b und 220b mit schwachen Hybridisierungssignalen identifiziert werden. Das Transkriptfragment von 600b, das in allen anderen Hybridisierungsproben nachgewiesen werden konnte, konnte mit dieser Probe nicht identifiziert werden.

Eine Zusammenfassung der nach Hybridisierung mit spezifischen PhiX174 DNA-Sonden aufgetretenen PL-GenD/E-mRNAs ist in Tab. 11 aufgezeigt.

Die mRNA-Klassen von 600b und 420b hybridisierten nur mit Sonden, die Gen D- und E-spezifische Sequenzen umfaßten (Probe 1-4), und mußten daher 3'-terminal deletiert sein. Mit DNA-Sonde 2, die den ganzen 5'-terminalen Bereich von Gen E und teilweise von Gen D überdeckte, konnte ein 340b Transkriptfragment, das mit allen übrigen Proben hybridisierte, nicht nachgewiesen werden. Diese mRNA-Spezies konnte nur durch Prozessierung am 5'-Ende der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA entstanden sein, die zu einer Deletion des Translationsinitiationssignals von Gen D führt. Das 220b mRNA-Fragment resultierte aus einer 5'-Prozessierung, da nur 3'-Bereiche von Gen D- und E-überdeckenden DNA-Sonden (Probe 3-5) ein Hybridisierungssignal lieferten. Alle übrigen identifizierten mRNA-Spezies zeigten im Vergleich eine wesentlich schwächere Intensität. Die starke Intensität des 220b Transkripts ist bisher nicht zu erklären. Eine verstärkte interne Prozessierung des intakten Transkripts, die zu einem 220b mRNA-Fragment führen würde, müßte gleichzeitig zum Auftreten der zusätzlich daraus resultierenden Spaltprodukte führen, falls diese nicht durch 3'-5'-Nukleasen sehr rasch abgebaut würden.

Die qualitative Analyse der $P_{L-GenD/E}$ -spezifischen mRNA-Klassen, die unter induzierten Bedingungen vom Expressionsvektor pSB35 gebildet werden, zeigte, daß die Bildung sowohl von 5'- und als auch 3'-terminal verkürzten mRNAs möglich ist. Das intakte Transkript, das mit einer hair-pin-Struktur am Terminator T_J endet, zeigte in allen Hybridisierungsexperimenten das stärkste Signal, was auf die stabilisierende Struktur am 3'-Ende zurückgeführt wurde. Durch den Nachweis zusätzlicher, bisher noch nicht beschriebener mRNA-Klassen der Gen D/E-mRNA wurde gezeigt, daß es zu einer Prozessierung des intakten Transkripts kommt.

Mit den aufgezeigten Daten können die aufgetretenen mRNAs nach folgendem Modell (Fig. 27) entstanden sein:

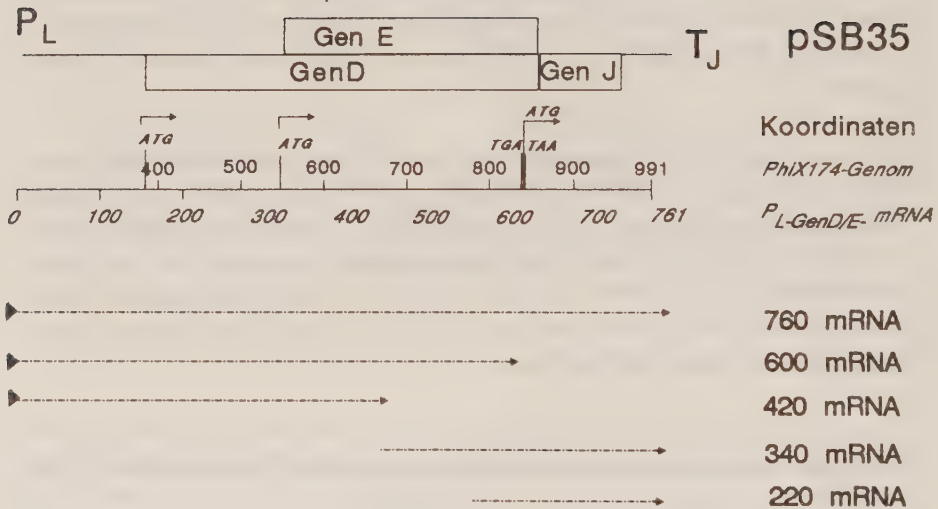


Fig.27 Modell der Prozessierungsreaktion von $P_{L-GenD/E}$ -mRNA und der resultierenden mRNA-Fragmente in *E. coli* pxi⁺ JF448(pcl857pSB35).

Ein Ausschnitt des Plasmids pSB35 mit den Genen D, E und J und dem Terminator T_J ist als Linie dargestellt. Ebenfalls dargestellt ist die $P_{L-GenD/E}$ -spezifische mRNA mit den Startcodons für die Translationsprodukte. Die Koordinaten oberhalb geben die Nukleotide gemäß der PhiX174-Genkarte nach Sanger et al. (1978) an. Im unteren Bereich sind dementsprechend die Koordinaten auf der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA wiedergegeben. Die gestrichelten Pfeile geben die aus den Hybridisierungsversuchen (Fig.26) ermittelten, möglichen Prozessierungsprodukte dieser mRNA an.

4.2. Analyse der mRNA-Klassen in *E. coli pxlA* nach Transkription von PL-GenD/E-mRNA vom Plasmid pSB35

Analog zu den Hybridisierungsexperimenten mit *E. coli pxl⁺* (Fig.26) erfolgte die Analyse der PL-GenD/E-spezifischen mRNAs in *pxlA* Mutanten (Fig.28). Zu ihrer Identifizierung wurden ebenfalls DNA-Sonden, die PhiX174 spezifische DNA-Sequenzen enthielten, eingesetzt (Fig.25).

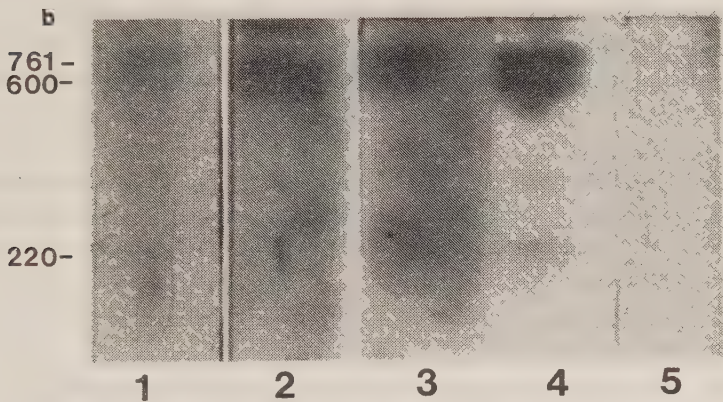


Fig. 28 Autoradiogramm der Northernanalyse von P1-GenD/E-mRNA in *E. coli pxlA GH56(pSB35)*

- | | |
|---------|--------------------------------|
| Spur 1: | Hybridisierung mit DNA-Sonde 1 |
| Spur 2: | Hybridisierung mit DNA-Sonde 2 |
| Spur 3: | Hybridisierung mit DNA-Sonde 3 |
| Spur 4: | Hybridisierung mit DNA-Sonde 4 |
| Spur 5: | Hybridisierung mit DNA-Sonde 5 |

Versuchsanordnung siehe Text. Die Größen der mRNAs wurden über die 23S, 16S und 5S rRNA als Längenstandard ermittelt.

Die qualitativen Analysen der Northernblots zeigten, daß in den Autoradiogrammen (Fig.28) das intakte Transkript von 761b und das 600b mRNA-Fragment mit fast gleicher Intensität mit DNA-Probe 1 (Spur 1), 2 (Spur 2), 3 (Spur 3) und 4 (Spur 4) hybridisierte (Fig.25). Hybridisierung mit dem 5'-terminal verkürzten 310b HaeIII-Fragment (Probe 4, PhiX174 721-1125)) und dem 404-TaqI-Fragment (Probe 5, PhiX174 906-1452)) zeigten zusätzlich ein Signal einer 220b mRNA, die ebenfalls in pxl^+ (Fig.26), jedoch mit wesentlich höherer Intensität, identifiziert wurde.

Ein vermehrtes Auftreten eines 3'-verkürzten 600b Transkriptfragments in $pxlA$ Mutanten konnte durch Northernanalysen mit verschiedenen DNA-Sonden (Fig. 28) nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Ergebnisse, die gezeigt hatten, daß das Gen E Produkt in $pxlA$ Mutanten von *E. coli* durch verstärkte Prozessierung der mRNA nur bedingt gebildet werden kann.

Es war auffällig, daß dieses 3'-verkürzte Transkript mit fast gleicher Intensität und mit anscheinend gleicher Lebensdauer wie das Intakte Transkript im Autoradiogramm auftrat.

Wie schon erwähnt, wird der PhiX174 GenD/E-mRNA durch eine hair-pin-Struktur am 3'-Ende stabilisiert und vor 3'-5'-Exonukleasen geschützt.

Durch Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Bereichs der mRNA, die als 3'-Ende des 600b mRNA-Fragments in Betracht kommt, sollte näher geklärt werden, ob Signalstrukturen bestehen, die als Terminator, Endo-RNase-Angriffsstelle oder mRNA-Stabilisierungssequenzen zur Bildung dieses Transkriptfragments führen.

5. Untersuchungen zur Sekundär- und Tertiärstruktur Gen D/E spezifischer mRNA

Neben der Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur der von Lambda P_L aus synthetisierten GenD/E-spezifischen mRNA des Plasmid pSB35 (Fig.29 B) wurde auch die mRNA-Spezies XIII, die *in vivo* und *in vitro* vom PhiX174 Promotor P_D transkribiert wird und am spezifischen rho-unabhängigen Terminator T_J endet und 634b umfaßt (Hayashi et al., 1976), in die Betrachtungen einbezogen (Fig.29A). Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Sequenzen des pSB35 Lambda $P_{LGenD/E}$ -Transkripts an Position 550-600 (Fig.29B) und der PhiX174 mRNA-Klasse XIII an Position 430-480 (Fig.29A) wurden durch zwei unabhängige Computerprogramme nach Algorithmen von Tinoco et al. (1973) und Lang und Burger (1986) untersucht.

Durch Analysen der Sekundär- und Tertiärstruktur nach Lang und Burger (1986) lassen sich für die mRNA-Spezies XIII bei Nukleotid 445-469 und die Lambda $P_{LGenD/E}$ -mRNA bei Nukleotid 566-580 stabile hair-pin-Strukturen ($G = -15.7$ kcal) aufzeigen (Fig. 30A). Um eine mögliche Wechselwirkung und Beeinflussung durch umgebende Sequenzen und Strukturen mit dem analysierten Bereich auszuschließen, wurden weitere Analysen durchgeführt, die zusätzliche 3'-und 5'-Bereiche des

Moleküls einbezogen.

Analysen der PhiX174 mRNA-Klasse XIII (Nukleotid 430-643 des Transkripts) und der PL-GenD/E-mRNA (Nukleotid 550-761) die 3'-Bereiche der hair-pin-Struktur am T_J einschließen zeigten, daß der 3'-endende T_J stem-loop keinerlei Einfluß auf die Stabilität der hair-pin-Struktur auf der PL-GenD/E-mRNA (bei Position 566-590) und der PhiX174 mRNA-XIII (bei Position 445-469) hat (Fig.30 B) .

Wurden für die mögliche Strukturvorhersage zusätzliche 5'-Bereiche der PL-GenD/E-mRNA von Nukleotid 300-594 (PhiX174 mRNA-Klasse XIII von Nukleotid 179-473) einbezogen, so konnte für die oben aufgezeigte hair-pin-Struktur ebenfalls keine Beeinflussung festgestellt werden (Fig.30 C). Im Anhang ist die Gesamtheit aller möglichen Basenpaarungen auf der PhiX174 mRNA-Klasse XIII (Anhang .1) und der PL-GenD/E-mRNA (Anhang .2) wiedergegeben.

Untersuchungen beider Transkripte über ein Computerprogramm (Microgenie, Beckman) nach Algorithmen nach Tinoco et al. (1973) ergaben auf der PL-GenD/E-mRNA bei Nukleotid 556-601 (PhiX174 mRNA XIII bei Position 435-479) eine ausgeprägte stem-loop-Struktur (Fig. 31). Alle anderen möglichen intramolekularen Basenpaarungen nach Tinoco et al.(1973) sind im Anhang (.3) aufgezeigt. Die durchgeführten Computervorhersagen der möglichen mRNA Sekundär-und Tertiärstruktur der PhiX174 mRNA XIII und der PL-GenD/E-mRNA zeigten, daß neben der hair-pin-Struktur an T_J die Ausprägung einer weiteren stabilen stem-loop-Struktur auf dem Transkript möglich ist.

Prokaryotische mRNA enthält häufig Strukturen, die den Umsatz dieser mRNA (Synthese, Prozessierung, Termination) in Bakterien beeinflussen. Die durch Northernanalysen nachgewiesene, verstärkt in *pxIA* Mutanten aufgetretene mRNA von 600b kommt als mögliches Produkt einer ersten endonukleolytischen Spaltung in Betracht, da die Struktur im 3'-Bereich der mRNA als Angriffstelle für Endonukleasen fungieren kann (weitere Erläuterung siehe Diskussion). Durch die ausgeprägte stem-loop-Struktur am 3'-Ende des 600b-Transkriptfragments kann zugleich eine Stabilisierung des Moleküls erfolgen, wodurch es eine verlängerte Lebensdauer erhält, was experimentell durch den relativ hohen Gehalt dieser mRNA in *pxIA* Mutanten gezeigt wurde.

Da in *pxIA* Mutanten die Expression von Protein D und E von Plasmid pSB35 herabgesetzt war, wurde vermutet, daß durch die Mutation auch die Synthese anderer plasmidkodierter Gene beeinflusst sein könnte. Aus diesem Grund wurde die Expression und enzymatische Aktivität von β -Galaktosidase in *pxIA* Mutanten untersucht.

Fig.29 A PhiX174 mRNA Spezies XIII

10	20	30	40	50	60
GAGUCCGAUG	CUGUUCAACC	ACUAAUAGGU	AAGAAAUCAU	GAGUCAAGUU	ACUGAACAAU
		rbs Gen D			
70	80	90	100	110	120
CCGUACGUUU	CCAGACCGCU	UUGGCCUCUA	UUAAGCUCAU	UCAGGCUUCU	GCCGUUUUGG
130	140	150	160	170	180
AUUUAACCGA	AGAUGAUUUC	GAUUUUCUGA	CGAGUACAA	AGUUUGGAUU	GCUACUGACC
190	200	210	220	230	240
GCUCUCGUGC	UCGUCGCGC	GUUGAGGCUU	GCGUUUAUGG	UACGCUGGAC	UUUGUGGGAU
		rbs Gen E			
250	260	270	280	290	300
ACCCUCGCUU	UCCUGCUCCU	GUUGAGUUUA	UUGCUGCCGU	CAUUGCUUUAU	UAUGUUCAUC
310	320	330	340	350	360
CCGUACAACU	UCAAACGGCC	UGUCUCAUCA	UGGAAGGCGC	UGAAUUUACG	GAAAACAUUA
370	380	390	400	410	420
UUAAUGGCGU	CGAGCGUCCG	GUUAAAGCCG	CUGAAUUGUU	CGCGUUUACC	UUGCGUGUAC
<i>lac240</i>					
430	440	450	460	470	480
GCGCAGGAAA	CACUGACGUU	CUUACUGACG	CAGAAGAAAA	CGUGC GUCAA	AAAUACGUG
				<i>lac55</i>	
490 * ** ***500		510	520	530	540
CGGAAGGAGU	<u>GAUGUAAUGU</u>	<u>CUAAAGGUAA</u>	<u>AAAACGUUCU</u>	GGCGCUCGCC	CUGGUCGUCC
Ende E / D		T₂			
550	560	570	580	590	600
GCCAGCCGUU	GCGAGGUACU	AAAGGCAAGC	GUAAAGGGCG	CUCGUCUUUG	GUAUGUAGGU
610	620	630	640		
GGUCAACAACU	UUUAAUUGCA	<u>GGGGCUUCGG</u>	<u>CCCCUACUU</u>	GAG	
		T₃			

Fig.29 A. Nukleotidsequenz der PhiX174 mRNA-Klasse XIII

Das 643 Nukleotide lange Transkript von PhiX174 Klasse XIII mRNA wird in vivo vom PhiX174 Promotor P_D bei Nukleotid 367 nach Sanger et al. (1978) aus transkribiert und endet am spezifischen Terminator T₃. Die Shine-Dalgarno-Sequenzen und die Startkodons von Gen D und Gen E sind besonders gekennzeichnet. Angegeben (unterstrichene Sequenzen) sind ebenfalls der spezifische Terminator T₁ (Hayashi et al., 1976) und der postulierte Terminator T₂ (Axelrod 1976, McMahon und Tinoco 1978). Sequenzen, die Homologien zu Sequenzen der lac-mRNA aufweisen (weitere Erläuterungen in V. Diskussion) sind kursiv dargestellt.

B. Nukleotidsequenz der P_{L-GenD/E}-mRNA von Plasmid pSB35

Die Synthese des 761 Nukleotide langen P_{L-GenD/E}-Transkripts beginnt an Lambda P_L und endet am spezifischen Terminator T₃. Alle weiteren Kennzeichnungen wie unter A.

Fig.29 B. Lambda PL-*genD/E* mRNA von Plasmid pSB35

10	20	30	40	50	60
AUCAGCAGGA	CGCACUGACC	ACCAUGAAGG	UGACGCUCUU	AAAAUUAAGC	CCUGAAGAAG
70	80	90	100	110	120
GGCAGCAUUC	AAAGCAGAAG	GCUUUGGGGU	GUGUGAUACG	AAACGAAGCA	UUGGAUUUC
130	140	150	160	170	180
UGAGUCCGAU	GCUGUUCAAC	CACUAAUAGG	UAAGAAAUCA	UGAGUCAAGU	UACUGAACAA
		rbs	Gen D		
190	200	210	220	230	240
UCCGUACGUU	UCCAGACCGC	UUUGGCCUCU	AUUAAGCUCA	UUCAGGCUUC	UGCCGUUUUG
250	260	270	280	290	300
GAUUUAACCG	AAGAUGAUUU	CGAUUUUCUG	ACGAGUAACA	AAGUUUGGAU	UGCUACUGAC
310	320	330	340	350	360
CGCUCUCGUG	CUCGUCGCUG	CGUUGAGGCU	UGCGUUUAUG	GUACGCUGGA	CUUUGUGGGA
		rbs	Gen E		
370	380	390	400	410	420
UACCCUCGCU	UUCCUGCUCC	UGUUGAGUUU	AUUGCUGCCG	UCAUUGCUUA	UUAUGUUCAU
430	440	450	460	470	480
CCCGUCAACA	UUCAACGGC	CUGUCUCAUC	AUGGAAGGCG	CUGAAUUUAC	GGAAACAUU
490	500	510	520	530	540
AUUAAUGGCG	UCGAGCGUCC	GGUUAAGGCC	GCUGAAUUGU	UCGCGUUUAC	CUUGCGUGUA
<i>lac240</i>					
550	560	570	580	590	600
CGCGCAGGAA	ACACUGACGU	UCUACUGAC	GCAGAAGAAA	ACGUGC <i>GUCA</i>	<i>AAAAUACGU</i>
				<i>lacs</i>	
610	***	630	640	650	660
GCGGAAGGAG	UGAUGUAUG	UCUAAAGGUA	AAAAACGUUC	UGGCGCUCGC	CCUGGUCGUC
	Ende E Ende D	T₂			
670	680	690	700	710	720
CGCAGCCGUU	GCGAGGUACU	AAAGGCAAGC	GUAAGGCGC	UCGUCUUUGG	UAUGUAGGUG
730	740	750	760		
GUACAACAAU	UUAUUUCAG	GGGCUUCGGC	CCCUUACUUG	A	
		T₃			

Energy: -15.7kcal

A



energy : -15.7 kcal

566 -UGACGCA- 572

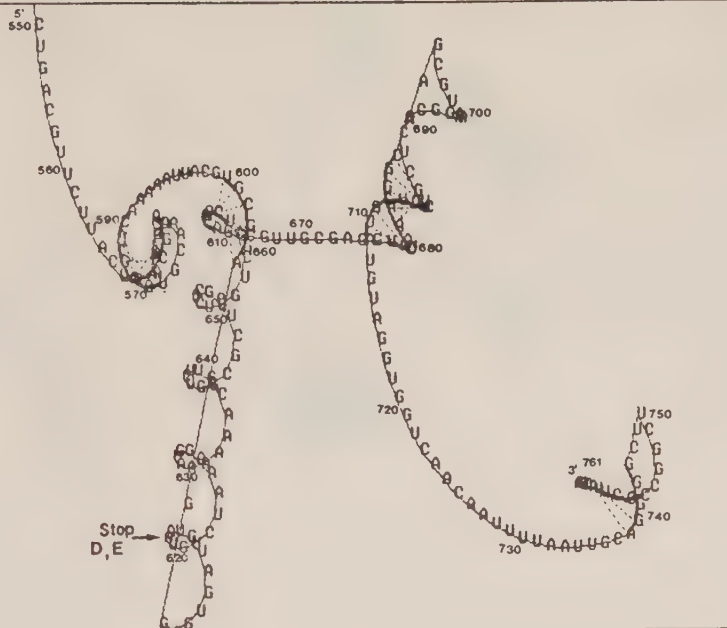
589 -ACUGCGU- 583

Fig. 30 Tertiärstruktur der energetisch stabilsten Strukturen von selektierten mRNA-Längen der PhiX174-mRNA und der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA mit dem Computerprogramm RNASE nach Algorithmen von Lang und Burger (1986)

Die mRNA-Sequenz der PhiX174 Klasse XIII und der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA sind bis auf die ersten 121b der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA identisch. Die Nukleotidpositionen sind jeweils für die $P_{L-GenD/E}$ -mRNA (Fig. 29B) angegeben und die entsprechenden Nukleotidpositionen der PhiX174 Klasse XIII mRNA (Fig. 29A) in Klammern gesetzt.

- Mögliche Tertiärstruktur der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA von Nukleotid 550-600 (PhiX174 mRNA XIII 430-480) mit einer freien Energie $G = -15,7\text{kcal}$.
- Mögliche Tertiärstruktur der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA von Nukleotid 550-761 (PhiX174 mRNA XIII 430-643) mit einer freien Energie $G = -55,8\text{kcal}$.
- Mögliche Tertiärstruktur der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA von Nukleotid 300-594 (PhiX174 mRNA XIII 179-473) mit einer freien Energie $G = -72,8\text{kcal}$.

B



599 -UGCGGA- 604

663 -ACGCCU- 658

566 -UGACGCA- 572

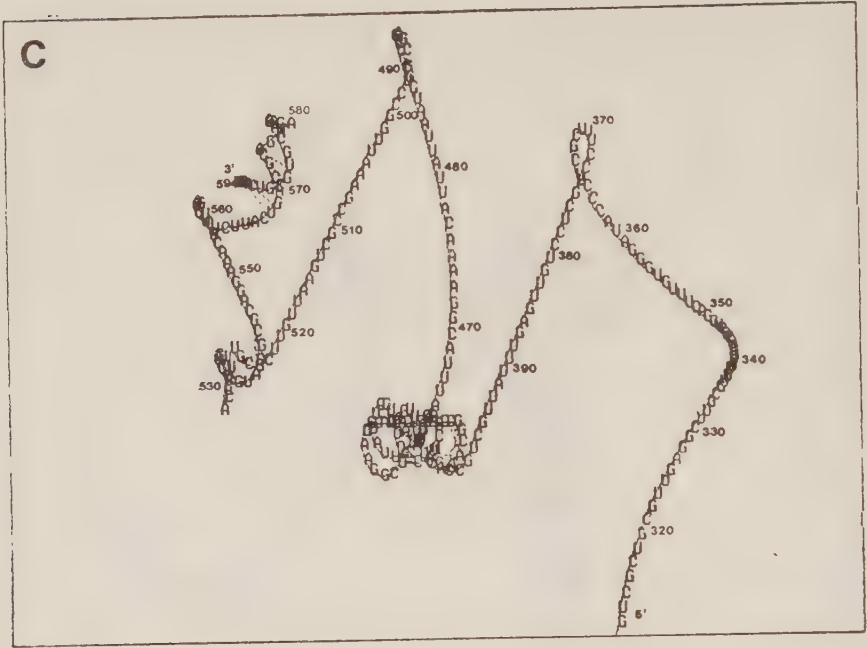
589 -ACUGCGU- 583

676 -UGC UAAAGGC- 685

711 -AUGGUUUCUG- 702

738 -AGGGG- 743

755 -UUCCC- 702



energy : -17.0 kcal
 366 -CGCUUUC- 373
 459 -GCGGAAG- 452

energy : -15.7 kcal
 566 -UGACGCA- 572
 589 -ACUGCGU- 583

energy : -14.2 kcal
 198 -GCUUUGGCC- 206
 508 -CGAAAUUG- 500

energy : -13.7 kcal
 521 -GCGGU- 525
 543 -GCGCA- 539

energy : -12.2 kcal
 192 -GAGCGUC- 198
 261 -CUUGCAG- 255

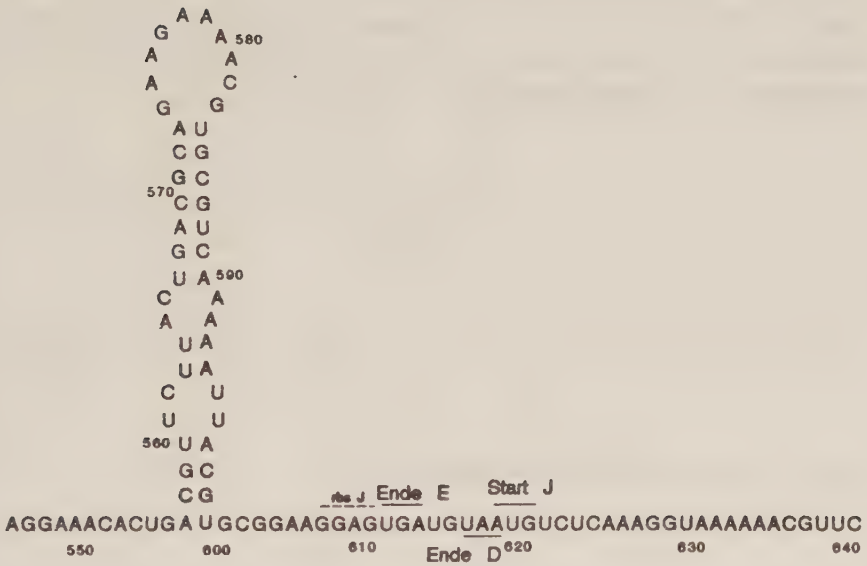


Fig.31 Mögliche Sekundärstruktur der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA bei Nukleotid 545-630 und der Φ X174 mRNA-Klasse XIII von Nukleotid 425-509 mit dem Computerprogramm Microgenie nach Algorithmen von Tinoco et al.(1973).

Die Nukleotidpositionen sind für die $P_{L-GenD/E}$ -mRNA (Fig. 29B) angegeben.

6. Quantifizierung der β -Galaktosidaseaktivität nach Expression des *lacZ* Gens von Plasmid pSB85-1 in *E. coli pxiA*

Das Plasmid pSB85-1 (Fig. 32) trägt das gesamte *lacZ* Gen und die *lacZ*-spezifischen Kontrollsignale (Bläsl 1987); aufgrund der fehlenden *lacI*-Repressorfunktion wird von Plasmid pSB85-1 β -Galaktosidase konstitutiv exprimiert. Eine Beeinflussung der plasmidkodierten *lacZ*-Expression in *pxiA* Mutanten würde zu einer Reduktion der β -Galaktosidaseaktivität führen.

E. coli GH56 *pxiA* und *E. coli* JF448 *pxi*⁺ wurden mit Plasmid pSB85-1 transformiert. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,8 angezogen, 0,5 ml Aliquots mit Lysozym/EDTA aufgeschlossen und die β -Galaktosidaseaktivität im jeweiligen Gesamtzellextrakt gemessen. Als Kontrolle dienten die plasmidfreien Stämme JF448 und GH56 (Tab. 12).

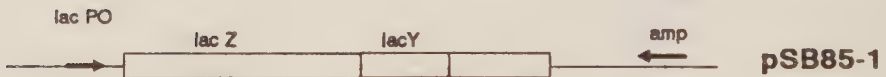


Fig.32 Vereinfachte Darstellung des Plasmids pSB85-1

Tab. 12 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in *E. coli* JF44(pSB85-1) *pxi*⁺ und GH56(pSB85-1) *pxiA*.

Stamm	β -Galaktosidaseaktivität (U)
JF448	33
JF448(pSB85-1)	1701
GH56	49
GH56(pSB85-1)	1711

Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte nach Miller (1972).

Da die β -Galaktosidaseaktivität nach konstitutiver Expression von Plasmid pSB85-1 in *E. coli* JF448(pSB85-1) **pxl**⁺ und GH56(pSB85-1) **pxIA** gleiche Werte erreichte, war anzunehmen, daß die chromosomale Mutation **pxIA** keinen allgemeinen Effekt auf die Transkription oder Prozessierung von mRNA hat. Es scheint vielmehr, daß die **pxIA** Mutation eine spezifische Wirkungen auf die P_{L_{GenD/E}}-Transkripte ausübt.

D. Klonierung der *pxIA*-Sequenz

1. Klonierungsstrategie

Die Klonierung des Strukturgens, das durch die *pxIA* Mutation charakterisiert wird, sollte näheren Aufschluß über den *pxIA* Phänotyp geben. Die Mutation, die, wie schon gezeigt, eindeutig auf dem Chromosom von *E. coli* lokalisiert werden konnte, sollte auf einem Plasmid subkloniert werden. Es war nicht bekannt, ob ein oder mehrere Genprodukte oder die Veränderung einer regulatorischen Genfunktion zur beobachteten Erhöhung der zellulären Nukleaseaktivität geführt hatten. Durch erste Klonierung von großen DNA-Fragmenten in einer Cosmid-Genbank sollte der *pxIA* Abschnitt mit notwendigen Strukturgenen erfaßt werden.

Durch bereits geschilderte F'-Kreuzungsversuche konnte gezeigt werden, daß *pxIA* nicht komplementiert werden kann und daher dominant wirkt. Der Klonierungsweg über die *E. coli* *pxIA* Mutante GH56 bot daher den Vorteil, daß durch die Transformierbarkeit mit Lyseplasmiden eine positive Selektion auf rekombinante Plasmide, die die *pxIA* Sequenz tragen, zur Verfügung stand.

Der Cosmidvektor pHC79 wurde als Vektor für die Klonierung von chromosomalen DNA-Fragmenten und die anschließende *in vitro*-Verpackung in Lambda-Phagenköpfe ausgewählt. Da der Cosmidvektor pHC79 über das ColE1 Replikon repliziert, wurde zur Nachselektion auf *pxIA* (siehe Kapitel B) das Lyseplasmid pAW13 (Fig. 33) verwendet, das den zu ColE1 kompatiblen p15A Origin besitzt.

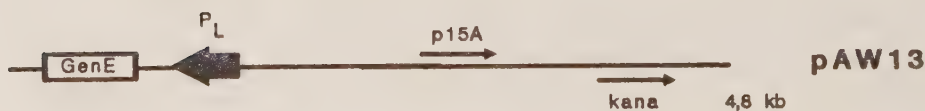


Fig.33 Übersichtskarte des Plasmids pAW13

Gen E steht im Plasmid pAW13 unter transkriptioneller Kontrolle von Lambda P_L . Das Plasmid repliziert über den p15A Origin und trägt Kanamycin als Resistenzmarker.

2. "Shot-gun"-Klonierung der *pxIA*-Sequenz

Chromosomale DNA aus *E. coli* GH56 *pxIA* wurde partial mit *Sau3A* gespalten und Fragmente mit 30-45kb über einen Saccharosegradienten gereinigt und isoliert. Cosmid-DNA des Vektors pHC79 wurde mit *Bam*HI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt. 1,5 ug chromosomale DNA und 3 ug Vektor-DNA wurden mit T4-Ligase kovalent gebunden und 4 ug des Ligationsansatzes *in vitro* in Lambda verpackt (Lambda-Vitro-Packing-Kit, Amersham).

Zur Austitrierung des Cosmid-Bank wurde *E. coli* HB101 mit den Lambda-Phagen infiziert. Pro ug DNA wurden ungefähr 10^6 Amp^r Klone erhalten. Ungefähr 5000 rekombinante Klone wurden auf den Phänotyp *pxIA* getestet. Die direkte Selektion auf *pxIA* erfolgte dabei durch "Poolen" der 5000 Amp^r-Kolonien und anschließender Transformation mit Plasmid pAW13 (Kan^r). Als Kontrolle wurde gleichzeitig der Ausgangsstamm *E. coli* HB101 transformiert. Drei positive Amp^r Kan^r Klone, die rekombinante pHC79-Plasmide (Plasmid pGH79-1, pGH79-2, pGH79-3) und das Plasmid pAW13 enthielten, konnten isoliert werden. Zur Trennung der beiden Plasmide wurde Plasmid-DNA aus Amp^r Kan^r Kolonien präpariert, in *E. coli* HB101 transformiert und auf Amp^r Kan^S selektioniert. Das rekombinante Plasmid pGH79-1 wurde näher untersucht. Nach Isolierung der pGH79-1 Plasmid-DNA wurde zur physikalischen Kartierung die DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Restriktionskarte von pGH79-1 ist in Fig.34 dargestellt. Plasmid pGH79-1 enthält ein ungefähr 24kb großes *Bam*HI-Fragment chromosomaler DNA aus *E. coli* GH56 *pxIA*.

3. Subklonierung von *pxIA* in Plasmid pBR322

Auf dem 24kb *Bam*HI-Fragment von Plasmid pGH79 sollte der Bereich eingegrenzt und identifiziert werden, auf dem sich die DNA-Sequenzen befinden, die zur Ausprägung von *pxIA* führen. Dazu wurde eine Reihe von kleineren *Bam*HI-, *Eco*RI-, *Eco*RI-*Bam*HI-Fragmenten isoliert und in den Plasmid-Vektor pBR322, der zuvor mit *Bam*HI, *Eco*RI oder *Bam*HI/*Eco*RI gespalten worden war, ligiert. Inserierung von DNA-Fragmenten in die *Bam*HI-Schnittstelle von pBR322 führt zur Inaktivierung des Tet^r-Gens. Rekombinante Klone konnten daher durch Selektion auf Amp^r Tet^S leicht gefunden werden und durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI, *Eco*RI oder *Bam*HI/*Eco*RI die Größe der Insert-DNA bestimmt werden. Die rekombinanten Plasmide, auf denen sich die für *pxIA* kodierende Sequenz befand, wurden durch Nachtransformation mit Plasmid pAW13 selektioniert. Die intakte *pxIA*-Sequenz wurde auf einem 11,7 kb *Bam*HI-Fragment (pGH80) und einem 4,6kb *Bam*HI/*Eco*RI-Fragment (pGH81) identifiziert (Fig.34), das als kleinstes der getesteten DNA-Fragmente die vollständige Information für *pxIA* trug.

Durch Restriktionskartierung mit verschiedenen Enzymen wurde pGH81 näher charakterisiert (Fig.35). Eine Zusammenfassung der konstruierten Plasmide ist in Tab. 13 aufgeführt.

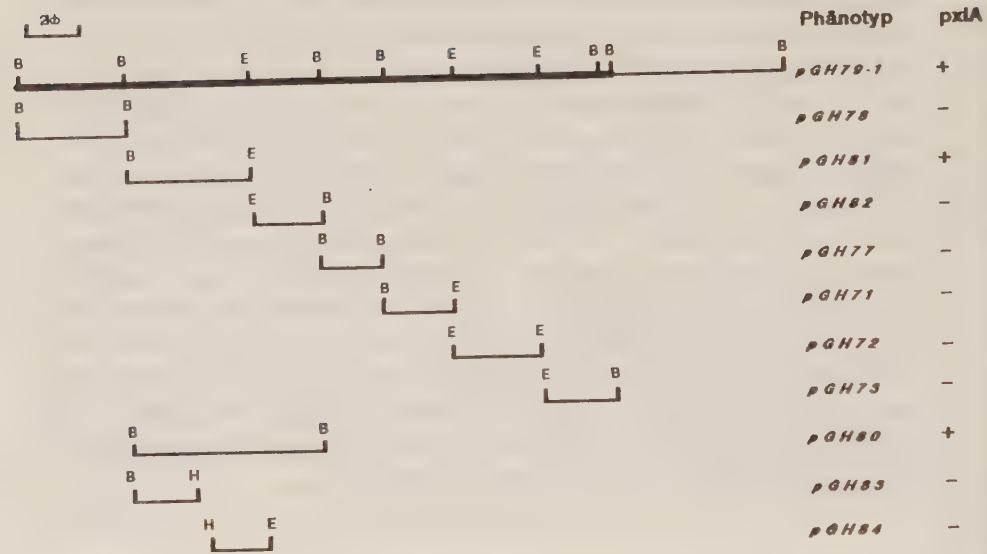


Fig.34 Ausprägung des *pxtA* Phänotyps in pGH-Plasmiden

Eine Reihe von kleineren DNA-Fragmenten wurde nach Restriktionsverdau von Plasmid-DNA pGH79-1 in pBR322 Vektor-DNA ligiert. Auf die Ausprägung des *pxtA*-Phänotyps wurden die pGH-Subklone durch Nachtransformation mit dem Lyseplasmid pAW13 getestet.

In Plasmid pGH79-1 ist die klonierte chromosomale Sequenz (dicke Linie) und der pHC79 Cosmid-Vektor-Anteil (dünne Linie) gekennzeichnet. Für die pGH-Subklone sind jeweils nur die in pBR322 klonierten chromosomalen Fragmente dargestellt.

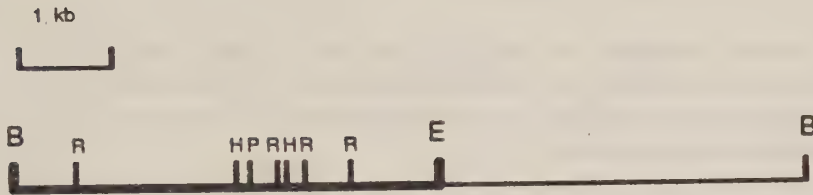


Fig.35 Physikalische Karte von Plasmid pGH81

Restriktionsstellen für *EcoRI*(E), *BamHI*(B), *HindIII*(H), *RsaI*(R) und *PstI*(P) sind eingezeichnet. Restriktionen mit *AclI*, *BglI*, *EcoRV*, *SalI* ergaben keine Fragmentierung der 4,6 kb Insert-DNA (dicke Linie). Der Plasmid-Vektor pBR322 (*EcoRI*/*BamHI*) ist als dünne Linie dargestellt.

Tab.13 Subklonierung von *pxlA*

Plasmid	Vektor kb	Größe	Resistenz kb	Insertfragment
pGH79-1	pHC79	30,5	amp	24,0 BamHI/BamHI
pGH71	pBR322	6,8	amp	2,5 BamHI/EcoRI
pGH72	pBR322	7,4	amp	3,0 EcoRI/EcoRI
pGH73	pBR233	6,9	amp	2,6 EcoRI/BamHI
pGH76	pBR233	7,1	amp	2,8 EcoRI/BamHI
pGH77	pBR233	6,8	amp	2,3 BamHI/BamHI
pGH78	pBR233	8,3	amp	4,0 BamHI/BamHI
pGH80	pBR233	11,7	amp	7,3 BamHI/BamHI
pGH81	pBR233	8,6	amp	4,6 BamHI/EcoRI
pGH82	pBR233	6,7	amp	2,7 EcoRI/BamHI
pGH83	pBR233	6,5	amp	2,5 BamHI/HindIII
pGH84	pBR233	8,3	amp	4,3 HindIII/BamHI

Aufgelistet sind die rekombinanten Plasmide, die jeweils unterschiedliche Fragmente des 24 kb großen Ausgangsplasmids pGH79 enthielten.

4. Nachweis des Genprodukts von *pxlA*

Durch Analyse des Proteinmusters von *E. coli* HB101(pGH81) sollten die möglicherweise vom Plasmid pGH81 exprimierten Genprodukte mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Nach dem Färben des Proteingels mit Coomassie konnte jedoch kein eindeutiger Unterschied im Bandenmuster von HB101 und HB101(pGH81) festgestellt werden.

Da nicht bekannt war, ob die *pxlA*-Sequenz für ein Protein oder eine RNA kodiert, oder ob es durch Ausfall einer regulatorischen Zellfunktion zum *pxlA* Phänotyp kommt, war nicht unbedingt eine Veränderung im Proteinbandenmuster auch von plasmidhaltigen Zellen zu erwarten.

5. Rückhybridisierung des klonierten *pxlA* DNA-Segments mit chromosomaler DNA aus *E. coli* *pxl*⁺ und *pxlA*

Mit Hilfe von DNA-Hybridisierungsexperimenten sollte die Struktur des chromosomalen *pxlA* Genlocus sowohl in *pxlA* Mutanten als auch in *pxl*⁺-Zellen aufgezeigt werden. Gleichzeitig sollte der Nachweis erbracht werden, daß es während der Klonierung des *pxlA* Genlocus nicht zu Umlagerungen in der DNA gekommen war.

Chromosomale DNA aus *E. coli* GH56 *pxlA* und JF448 *pxlA*⁺ wurde mit EcoRI/BamHI in einem Doppelverdau geschnitten. Die Fragmente wurden auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt, auf Gene-Screen-Plus-Membranfilter transferiert und gegen das ³²P-markierte 4,6kb EcoRI/BamHI-Fragment aus Plasmid pGH81 hybridisiert. Das Autoradiogramm des Filters ist in Fig.36 gezeigt. Das Hybridisierungsmuster von EcoRI/BamHI-Fragmenten aus chromosomaler DNA von *E. coli* GH56 und JF448 war nicht identisch. Die genomische DNA von *E. coli* GH56 zeigte eine eindeutige Bande bei 4,6kb, die mit der 4,6kb BamHI/EcoRI DNA-Probe hybridisierte und war somit mit dem klonierten EcoRI/BamHI-Fragment in Plasmid pGH81 identisch. Im Gegensatz dazu war die Länge des hybridisierten EcoRI/BamHI-Fragments der genomischen DNA von *E. coli* JF448 ungefähr 10kb, also erheblich größer als die des klonierten Segments aus Plasmid pGH81.

Ein Zusammenhang zwischen genetischer und physikalischer Karte kann auf der Basis der Restriktionsmuster von Wildtyp und Mutanten bestimmt werden, sobald Mutationen zu größeren Veränderungen der genetischen Karte führen. Kleine Deletionen oder Insertionen, die die genetische Karte beeinflussen, können zu einer Reduktion oder einem Anstieg der Fragmentgrößen, auf denen sie lokalisiert sind, führen. Desweiteren können intramolekulare Rearrangements, die zu Mutationen führen, ein verändertes Restriktionsmuster von Wildtyp und Mutanten ergeben. Durch Klonierung des zu dem 4,6kb EcoRI/BamHI-Fragment aus Plasmid pGH81 homologen Wildtypgenom-Abschnitts sollte eine nähere Analyse der Ursache des Fragment-Größenunterschieds in *pxlA* und *pxl*⁺-Zellen aufgezeigt werden.

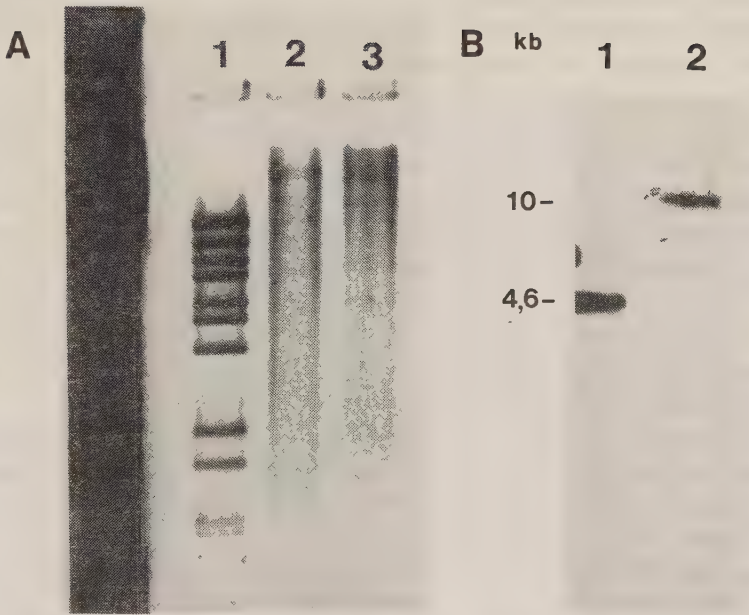


Fig.36 Autoradiogramm nach Rückhybridisierung der klonierten *pxtA*-Sequenz mit chromosomaler DNA aus *E. coli* GH56 und JF448

Chromosomale DNA aus *E. coli* GH56 und JF448 wurden mit *Bam*HI/*Eco*RI verdaut, elektrophoretisch auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt (A.) und auf Gene-Screen-Membranen geblottet. Die Hybridisierung (B.) erfolgte mit dem 32 P-markierten 4,6kb-Fragment aus Plasmid pGH81 (Fig.35).

A. Restriktionsmuster

Spur 1: Lambda *Bst*EI als Größenmarker (8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117 b)

Spur 2: chromosomale DNA aus *E. coli* GH56 nach *Bam*HI/*Eco*RI-Verdau

Spur 3: chromosomale DNA aus *E. coli* JF448 nach *Bam*HI/*Eco*RI-Verdau

B. Hybridisierungsmuster

Spur 1: chromosomale DNA aus *E. coli* GH56 nach *Bam*HI/*Eco*RI-Verdau

Spur 2: chromosomale DNA aus *E. coli* JF448 nach *Bam*HI/*Eco*RI-Verdau

6. Klonierung des *p_{xl}⁺* Wildtypallels

Hybridisierung des klonierten 4,6kb DNA-Abschnitts von Plasmid pGH81 mit chromosomaler DNA von *E. coli* JF448 machte ein einfaches "Screening" auf die entsprechende Wildtypsequenz in *p_{xl}⁺* Zellen möglich.

Da sich in Hybridisierungsversuchen mit chromosomaler DNA aus *p_{xlA}* und *p_{xl}⁺* gezeigt hatte, daß ein wesentlich größeres EcoRI/BamHI-Fragment der Wildtyp-DNA mit dem 4,6kb-EcoRI/BamHI-Fragment aus Plasmid pGH81 zu positiven Signalen führt, wurde mit chromosomaler DNA aus *E. coli* JF448 *p_{xl}⁺* ebenfalls eine Cosmid-Genbank angelegt.

Die nach in-vitro-Verpackung der DNA in Lambda-Phagenköpfe und Transfektion von *E. coli* HB101 erhaltenen Amp^r-Transformanten wurden durch Koloniehybridisierung mit dem 4,6kb EcoRI/BamHI-Fragment von Plasmid pGH81 auf positive Klone untersucht. Es wurde nur ein positiver Klon, Plasmid pJF79, erhalten. Durch Restriktionsverdau mit BamHI/EcoRI/HindIII wurde die ungefähre Größe des erhaltenen rekombinanten Plasmids pJF79 mit 34,1 kb bestimmt. Die Restriktionsanalyse des Plasmids pJF79 zeigte jedoch ein vollkommen unterschiedliches Restriktionsmuster zu Plasmid pGH81 (Fig.37).

Um eindeutig das Fragment zu identifizieren, auf dem sich die zum 4,6kb Segment des Plasmid pGH81 homologen Sequenzen befinden, wurde eine Southernblotanalyse durchgeführt.

Plasmid pGH81 und pJF79 wurden in einem Mehrfachverdau mit BamHI/EcoRI/HindIII geschnitten, die Fragmente auf einem 0,6% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Gene-Screen-Plus geblottet. Als Probe diente das 4,6kb EcoRI-BamHI-Fragment aus Plasmid pGH81 (Fig.35). Das Autoradiogramm des Membranfilters ist in Fig.38 zu sehen.

Auch hier konnte deutlich ein Unterschied im Hybridisierungsmuster der beiden Klone aufgezeigt werden. Die hybridisierten Fragmente von Plasmid pGH81 entsprachen dem vollständigen Restriktionsmuster des 4,6kb-Fragments von pGH81 nach HindIII/EcoRI/BamHI-Verdau (2,4 kb, 1,7 kb, 0,5 kb). Eindeutig ist jedoch ein Größenunterschied des hybridisierten Fragments von Plasmid pJF79 mit einer ungefähren Größe von 10kb zu erkennen.

Diese Differenz der Fragmentgrößen konnte möglicherweise auf die Klonierung von anderen Segmenten der chromosomalen DNA zurückzuführen sein, die zwar Homologie zur Hybridisierungsprobe zeigten, sich jedoch in einer vollkommen unabhängigen genomischen Umgebung befinden, so daß keine gleichen DNA-Fragmentgrößen nach BamHI/EcoRI/HindIII-Verdau bei den Plasmiden pJF79 und pGH81 gefunden werden konnten.

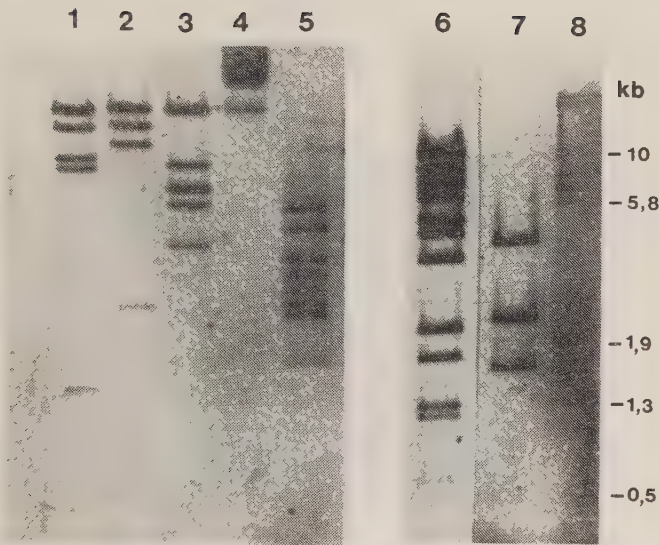


Fig.37 Restriktionsanalyse der Plasmide pGH79-1, pGH81 und pJF79

Die Plasmide pGH79-1 (Spur 5), pGH81 (Spur 7) und pJF79 (Spur 8) wurden mit *Bam*HI/*Eco*RI/*Hind*III in einem Mehrfachverdau gespalten. Als Größenmarker diente *Lambda*-DNA geschnitten mit *S*maI (19044, 12436, 7886, 6995, 1519, 604, 18) (Spur 1), mit *B*glII (22010, 13286, 9688, 2392, 651, 415, 60) (Spur 2), mit *E*coRI (21226, 7421, 5804, 5643, 4878, 3530) (Spur 3) und *B*stEII(8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117) (Spur 6). Die Größen der Plasmide nach *Bam*HI/*Eco*RI/*Hind*III-Verdau konnten für pGH79 mit 4800, 4000, 3300, 3000, 2500, 2400, 2300, 1700, 520, für pGH81 mit 4000, 2300, 1700, 520 und für pJF79 mit 10000, 7200, 6300, 5800, 1900, 1600, 1300 bestimmt werden. Die Größen geben die Zahl der Basenpaare in kb an.

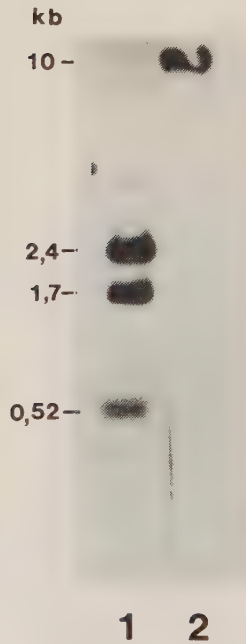


Fig.38 Autoradiogramm der Southernanalyse von pGH81 und pJF79 Plasmid-DNA

Plasmid-DNA von pGH81 und pJF79 wurden mit *Bam*HI/*Eco*RI/*Hind*III verdaut, elektrophoretisch auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte gegen das 32 P-markierte 4,6kb-DNA-Fragment aus Plasmid pGH81.

Spur 1: Plasmid pGH81 (Größen: 2,4kb, 1,7kb und 0,52kb)

Spur 2: Plasmid pJF79 (Größe: 10kb)

Eine eindeutige Aussage, ob in der **pxIA** Mutante aufgrund der gefundenen geringeren Fragmentlänge des für **pxIA** kodierenden DNA-Abschnitts eine Deletion, Insertion oder ein Rearrangement für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich ist, oder ob durch Klonierungsartefakte das entsprechende Wildtypallel nicht eindeutig identifiziert werden konnte, war nicht möglich.

Es wurden daher Hybridplasmide (pLC-) der Clark-Carbon-Bank (Clark und Carbon 1975, Clark und Carbon 1976), die chromosomale Bereiche des *E. coli* Chromosoms bei 83,3 min beinhalten, zur weiteren Untersuchung eingesetzt. Die pLC-Plasmide besitzen eine durchschnittliche Größe von 10-25 kb. Das Plasmid pLC20-47 hat eine Größe von 25,3 kb und enthält die kodierenden Sequenzen für **bgIB** (Neidhardt et al., 1983). Das **proT** ist auf den Plasmiden pLC35-38 (10 kb) und pLC4-45 (12 kb) lokalisiert. Restriktionsanalysen der Plasmide ergaben, daß EcoRI-Verdau von pLC20-47 zu Spaltung der DNA in ein 12 kb, 10 kb und 3,35 kb-Fragment führt. Die Plasmide pLC35-38 und pLC4-47 werden durch EcoRI lediglich linearisiert. Nachträglicher Verdau mit BamHI/HindIII veränderte das Restriktionsmuster der Plasmide nicht (Fig.39).

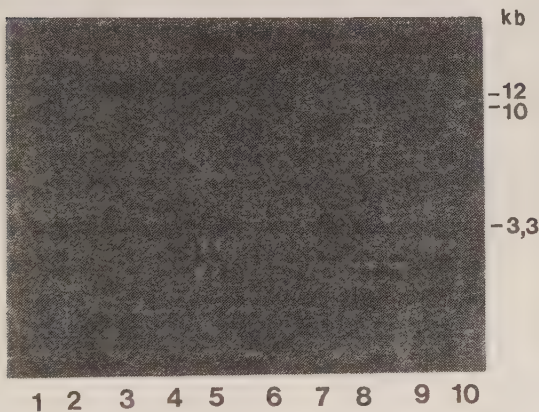


Fig.39 Restriktionsanalyse von pLC-Plasmiden

Die pLC-Plasmide pLC 20-47, pLC 25-38 und pLC 4-47 wurden mit EcoRI und EcoRI/BamHI/HindIII verdaut und gelelektrophoretisch auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt.

- | | |
|----------|---|
| Spur 1: | Lambda BstEII-Marker (Größen siehe Fig. 37) |
| Spur 2: | pLC 20-47 ungeschnitten |
| Spur 3: | pLC 20-47 EcoRI (12kb, 10kb, 3,3kb) |
| Spur 4: | pLC 20-47 EcoRI/BamHI/HindIII (12kb, 10kb, 3,3kb) |
| Spur 5: | pLC 25-38 ungeschnitten |
| Spur 6: | pLC 25-38 EcoRI (10kb) |
| Spur 7: | pLC 25-38 EcoRI/BamHI/HindIII (10kb) |
| Spur 8: | pLC 4-47 ungeschnitten |
| Spur 9: | pLC 4-47 EcoRI (12 kb) |
| Spur 10: | pLC 4-47 EcoRI/BamHI/HindIII (12kb) |

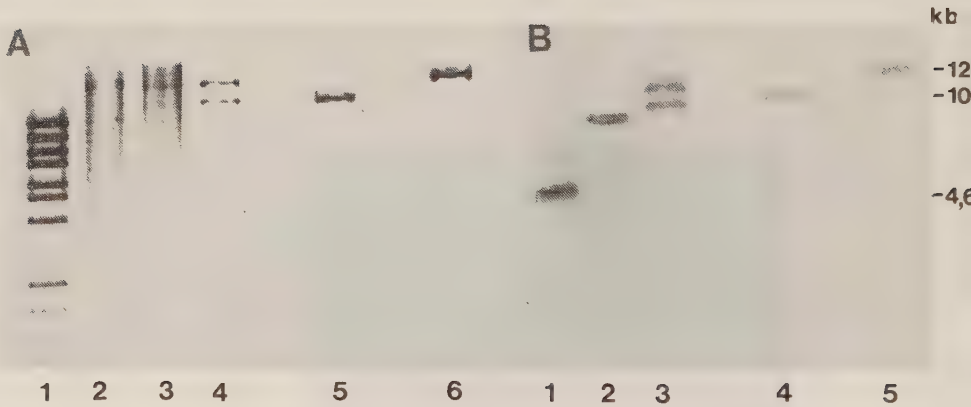


Fig.40 Autoradiogramm der Southernanalyse von pLC-Plasmiden und chromosomaler DNA von *E. coli* GH56 und JF448

Plasmid-DNA von pLC20-47, pLC35-38, pLC4-47 wurden mit *EcoRI/BamHI/HindIII* und chromosomale DNA aus *E. coli* GH56 und JF448 mit *EcoRI/BamHI* verdaut und nach elektrophoretischer Auftrennung im 0,6% Agarosegel auf Gene Screen-Filter transferiert. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte mit dem 32 -P-markierten 4,6kb Fragment aus Plasmid pGH81 (Fig.35).

A. Restriktionsmuster chromosomaler DNA aus *E. coli* GH56 (Spur 2), JF448 (Spur 3) und von Plasmid-DNA pLC20-47 (Spur 4), pLC35-38 (Spur 5) und pLC4-47 (Spur 6). Die Fragmentenlängen wurden mit Lambda *BstEII* als Größenmarker (Spur 1) bestimmt.

B. Hybridisierungsmuster chromosomaler DNA aus *E. coli* GH56 (Spur 1), JF448 (Spur 2) und von Plasmid-DNA pLC20-47 (Spur 3), pLC35-38 (Spur 5) und pLC4-47 (Spur 5).

Durch Southernblotanalyse sollte untersucht werden, ob das klonierte DNA-Fragment in Plasmid pGH81 auch mit Fragmenten der pLC-Plasmide hybridisierte (Fig. 40).

Auf dem Autoradiogramm Fig. 40 wurde in Plasmid pLC20-47, pLC35-38 und in chromosomaler DNA von *E. coli* JF448 das Signal eines 10 kb EcoRI/BamHI/HindIII-Fragments identifiziert. Mit der markierten DNA-Sonde hybridisierten ebenfalls ein 12 kb EcoRI/BamHI/HindIII-Fragment von Plasmid pLC20-47 und pLC4-45. Für die chromosomale DNA von *E. coli* GH56 konnte das Signal des 4,6 kb BamHI/EcoRI-Fragments identifiziert werden. Plasmid-DNA von pGH81 zeigte Hybridisierungssignale eines 2,5 kb-(BamHI/EcoRI), 1,7 kb-(HindIII/EcoRI) und 0,52 kb(HindIII)-Fragments und pJF79 eines 10 kb EcoRI/BamHI/HindIII-Fragments (Fig. 40 B).

Damit konnte gezeigt werden, daß das klonierte Fragment in Plasmid pGH81 homologe Sequenzen zu Fragmenten von pLC-Plasmiden, die DNA-Sequenzen des *E. coli* Chromosoms bei min 83 enthalten, ebenso wie zu einem 10 kb Fragment von Plasmid pJF79 besitzt.

Das Signal des 4,6 kb EcoRI/BamHI-Fragments chromosomaler DNA von *E. coli* GH56 **pxIA** im Vergleich zur 10 kb Bande von **pxl**⁺ *E. coli* JF448-DNA war möglicherweise die Folge größerer Veränderung wie Deletion, Insertion oder Rearrangements im Genom von **pxIA** Mutanten.

Untersuchungen zur Aufklärung dieser Veränderungen werden zur Zeit im Rahmen einer Diplomarbeit durch Sequenzierung des 4,6 kb DNA-Fragments chromosomaler DNA aus Plasmid pGH81 durchgeführt.

E. Einfluß der klonierten *pxiA*-Sequenz auf die Gen E und Gen D Expression in *E. coli*

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, daß die molekulare Ursache des lysenegativen Phänotyps von *pxiA* Mutanten auf einer verstärkten Prozessierung Gen E-spezifischer mRNA beruht. Eine verminderte Proteinsynthese resultierte aus dieser vermehrten Spaltung der mRNA und es kam zum Auftreten von C-terminal verkürztem Protein E und Protein D.

In Anwesenheit von Plasmid pGH81, das ein kloniertes 4,6kb *EcoRI*/*BamHI*-Fragment chromosomaler DNA aus *pxiA* Mutanten enthält, können Zellen gleichzeitig das Lyseplasmid pAW13 (Kapitel F.) tolerieren. Auf dem Plasmid pGH81 ist somit die zur Ausprägung des *pxiA* Phänotyps notwendige genetische Information vollständig kodiert.

Ob es in Anwesenheit des klonierten *pxiA*-Segments ebenfalls wie in *pxiA* Mutanten zu einer verstärkten Prozessierung der *P_{L-GenE}*- und *P_{L-GenD/E}*-spezifischen mRNA und demzufolge zu C-terminal verkürzten Proteinen kommt, sollte sowohl durch Northernanalyse von *P_{L-GenE}*- und *P_{L-GenD/E}*-spezifischer mRNA als auch durch Analyse der translatierten Proteine untersucht werden.

Für die Expression von Gen E in Gegenwart des *ColE1*-Derivats pGH81 stand das kompatible Plasmid pAW13 zur Verfügung. Zur gemeinsamen Expression von Gen D und Gen E erfolgte eine Umklonierung der Gene, da diese bisher nur vom Plasmid pSB35, ebenfalls ein *ColE1*-Derivat, exprimiert werden konnten.

1. Konstruktion von Plasmid pGH35

In Plasmid pSB35 ist die Expression der Gene D und E unter Kontrolle von *Lambda P_L*. Diese Kontrolle sollte erhalten bleiben und lediglich der *ColE1*-Replikationsorigin gegen den *p15A*-Origin ausgetauscht werden.

Aus dem Plasmid-Vektor pACYC177 wurde ein 2,62kb großes *PstI*/*BamHI*-Fragment isoliert, das den *p15A*-Origin, die kodierenden Sequenzen für die Kanamycin-Resistenz und einen Teil des für die β -Lactamase kodierenden *bla*-Gens enthält. Durch *PstI*/*BamHI*-Verdau von Plasmid pSB35 und Isolierung des 2,1kb-Fragments, das den *Lambda P_L*, Gen D und Gen E und Teile des *bla*-Gens trägt, und Ligation dieses Fragments mit dem 2,62kb *PstI*/*BamHI*-Fragment des Plasmids pACYC177 entstand Plasmid pGH35 (Fig.41).

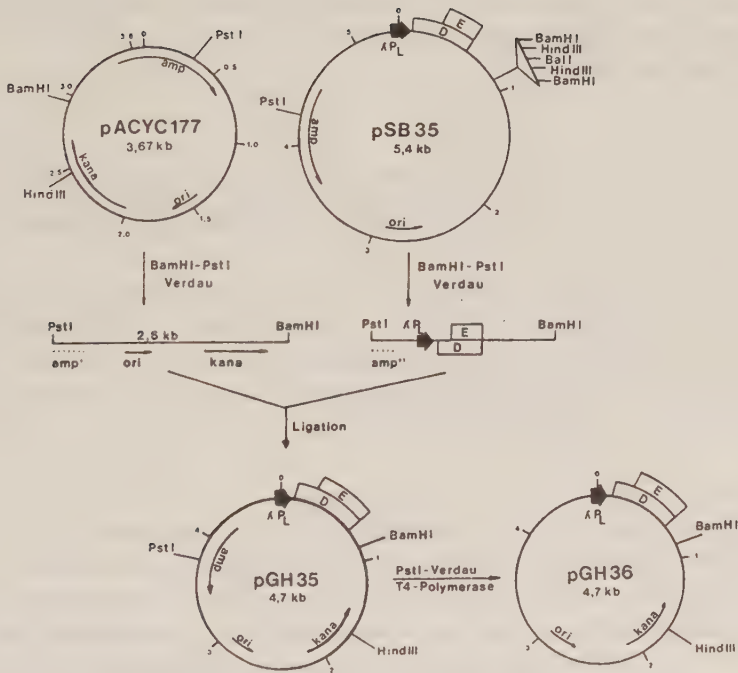


Fig.41 Konstruktion der Plasmide pGH35 und pGH36

Plasmid-DNA von pACYC177 wurde durch Doppelverdau mit *Pst*I und *Bam*HI fragmentiert und ein 2,6kb Fragment, das das *kan*-Gen, den p15A-Origin und Teile des *bla*-Gens enthält, isoliert. Nach Restriktionsverdau mit *Pst*I und *Bam*HI von Plasmid pSB35 wurde ein 2,1kbp Fragment, das die Gene *D* und *E* unter transkriptioneller Kontrolle von λ P_L trägt und Teile des *bla*-Gens enthält, isoliert. Nach Ligation beider Fragmente wurde das Plasmid pGH35 erhalten. Durch *Pst*I-Verdau und Abdauen der 3'-überstehenden Enden mit T4-Polymerase wurde die *Amp*-Resistenz in Plasmid pGH36 zerstört.

In Plasmid pGH35 wurde durch die Bindung der PstI-Restriktionsstelle das bla-Gen vollständig rekonstituiert. Neben der Gen D- und E-Expression unter der Kontrolle von Lambda P_L wird von diesem Plasmid die kanamycin- und die Ampicillin-Resistenz ausgedrückt. Die Replikation erfolgt über den p15A-Origin.

Plasmid pGH81 verleiht neben dem *pxIA* Phänotyp transformierten *E. coli* Zellen Resistenz gegen Ampicillin. Es war daher notwendig, das Amp-Resistenzgen aus Plasmid pGH35 zu deletieren. Durch Restriktionsverdau mit PstI, das innerhalb des bla-Gens schneidet, abdauen der überstehenden 3'-Enden mit T4-DNA-Polymerase und Religation wurde die Amp-Resistenz inaktiviert. Die Überprüfung positiver Klone erfolgte durch Replika-Plating auf Kan^rAmp^s. Das Kan^rAmp^s pGH35-Derivat wurde als Plasmid pGH36 bezeichnet (Fig.41).

2. Expression von Gen E vom Plasmid pAW13 und von Gen D und E gemeinsam vom Plasmid pGH36 im *pxIA* Hintergrund von Plasmid pGH81

Der Einfluß der klonierten *pxIA* Mutation auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* nach Expression von Gen E vom Plasmid pAW13 und von Gen E und D vom Plasmid pGH36 wurde untersucht. *E. coli* pop2135 und pop2135(pGH81) wurden mit Plasmid pAW13 (Gen E) oder Plasmid pGH36 (Gen D und E) transformiert. Die Induktion der Lambda P_L-nachgeschalteten Gene erfolgte durch Temperaturerhöhung der Kultur von 28°C auf 42°C (Fig.42).

Der Lyseeintritt erfolgte in *E. coli* pop2135(pAW13) und pop2135(pGH36) 12 min nach Temperaturerhöhung (bei O.D.₆₀₀ von 0,25) auf 42°C. In Anwesenheit von *pxIA* wuchsen *E. coli* pop2135(pGH81pAW13) und *E. coli* pop2135(pGH81pGH36) nach Temperaturerhöhung normal weiter, und zeigten aufgrund der erhöhte Wachstumstemperatur auch eine vermehrte Teilungsrate. Die Expression von Gen E hatte somit bei gleichzeitiger Expression von *pxIA* keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten von *E. coli* pop2135. Andererseits inhibierte die *pxIA*-Funktion das Wachstum der Zellen nicht, da sie sich mit normaler Rate weiter teilten. *pxIA* verhindert somit durch gerichtete Aktivität lediglich die Expression von funktionsfähigem Protein D und E und damit die Zellyse.

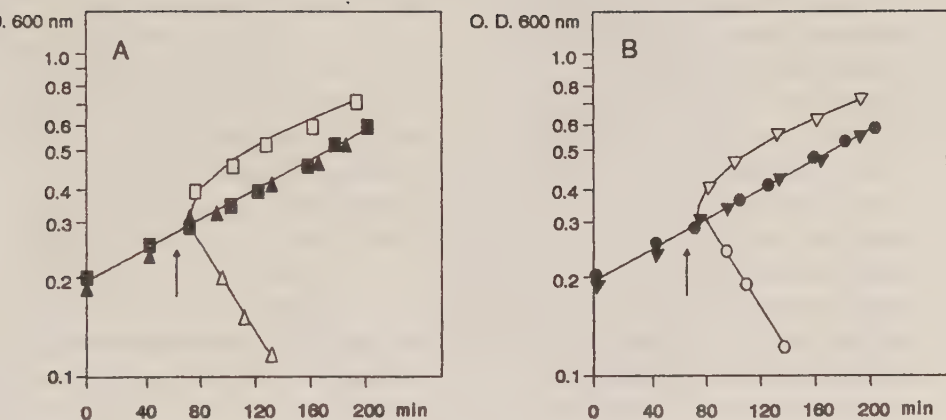


Fig.42 Einfluß der klonierten *pxlA*-Sequenz auf die Expression von Gen E und Gen D

A. *E. coli* pop2135(pAW13) (▲) und pop2135(pAW13pGH81) (■) wurden in Vollmedium bei 28°C bis zu einer O.D.600 von 0,25 angezogen. Die Gen E Expression wurde durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C (Pfeil) in *E. coli* pop2135(pAW13) (▽) und pop2135(pAW13pGH81) (■) induziert.

B. *E. coli* pop2135(pGH36) (●) und pop2135(pGH36pGH81) wurden in Vollmedium bei 28°C bis zu einer O.D.600 von 0,25 angezogen. Die Genexpression wurde durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C (Pfeil) in *E. coli* pop2135(pGH36) (○) und pop2135(pGH36pGH81) (▽) induziert. Der Wachstumsverlauf wurde photometrisch verfolgt.

3. Nachweis der Gen E- und Gen D-spezifischen Translationsprodukte nach Expression vom Plasmid pGH36 in Anwesenheit der klonierten *pxIA*-Sequenz

Proteinanalyse der nach Induktion der Genexpression von Lambda P_L vom Plasmid pSB35 in *pxIA* Mutanten translatierten Genprodukte (Fig. 16) hatte gezeigt, daß Protein D und Protein E in geringeren molaren Menge als in *pxI*⁺-Zellen gebildet werden, und daß es neben der Synthese von intakten Proteinen zur Bildung eines Protein D'-Fragments kommt. Für die klonierte *pxIA*-Sequenz sollte dieser Effekt auf die Synthese von Protein E und Protein D ebenfalls nachgewiesen werden (Fig. 43)

In *E. coli* pop2135(pGH36) konnte nach Induktion der Gen D- und Gen E-Expression Protein D als prominente Bande nachgewiesen werden (Fig 43, Spur 1). Im Proteinmuster von pop2135(pGH81pGH36) wurden an der Position von ungefähr 16 kD eindeutig zwei Proteinbanden identifiziert (Spur 4). Die Intensität des Signals der Protein D-Bande war wesentlich geringerer als in *E. coli* pop2135(pGH36). Das Molekulargewicht der beiden Proteine unterschied sich mit etwa 0,5-0,6 kD, wobei die Expression des größeren Proteins fast doppelt so hoch war wie die des verkürzten. Wie schon für die Expression von Protein D in *pxIA* Mutanten festgestellt wurde, wird auch unter Einfluß des klonierten *pxIA*-Segments sowohl ein intaktes als auch ein C-terminal verkürztes Protein D' gebildet.

Protein E konnte mit einem Molekulargewicht von 10 kD und einer schwächeren Intensität in Zellen, die neben Gen D und E auch *pxIA* vom Plasmid pGH81 exprimierten, nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Auflösung von Proteinen im niedermolekularen Bereich konnte ein mögliches verkürztes Protein E-Fragment nicht identifiziert werden.

Das Produkt des klonierten *pxIA*-Segments in Plasmid pGH81 zeigte somit den gleichen Einfluß auf die Protein E- und Protein D-Expression wie er schon in *pxIA* Mutanten festgestellt wurde.

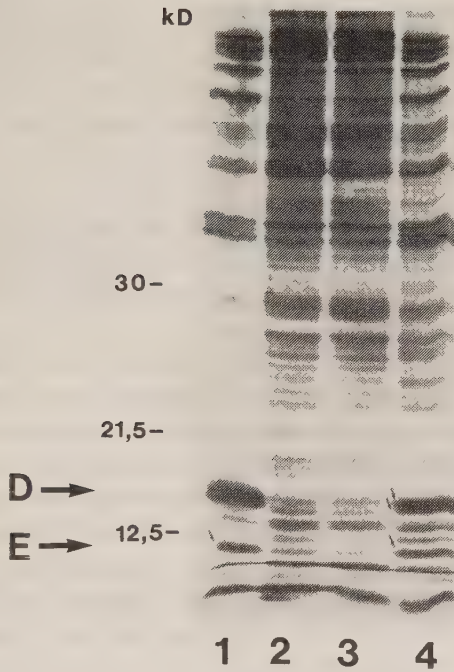


Fig.43 Einfluß der klonierten *pxt4*-Sequenz auf die Expression von Protein D und Protein E

Autoradiogramm des Proteinmusters ^{35}S -Methionin markierter Proteine von *E. coli* *pop2135*(pGH36) und *pop2135*(pGH36pGH81) bei 28°C und 42°C .

Spur 1:	<i>pop2135</i> (pGH36)	42°C
Spur 2:	<i>pop2135</i> (pGH36)	28°C
Spur 3:	<i>pop2135</i> (pGH36pGH81)	28°C
Spur 4:	<i>pop2135</i> (pGH36pGH81)	42°C

Das Molekulargewicht (kD) der Markerproteine und die Position von Protein D (D), Protein D'-Fragment (D') und Protein E (E) sind gekennzeichnet.

4. Nachweis $P_{L-GenD/E}$ -spezifischer mRNA nach Induktion der Genexpression vom Plasmid pGH36 unter Einfluß des klonierten *pxlA*-Segments in Plasmid pGH81

Zur Bestätigung der Ergebnisse, daß *pxlA* nicht posttranslational durch proteolytischen Abbau der Genprodukte von D und E, sondern durch Prozessierung der gebildeten mRNA wirkt, wurden die von P_L vom Plasmid pGH36 unter Einfluß von *pxlA* gebildeten Transkriptionsprodukte in Gegenwart von Rifampicin analysiert (Fig.44 A).

Northernanalyse der in *E. coli* pop2135(pGH36) auftretenden mRNAs (Fig.44 A, *Spur 1-4*) gegen eine Φ IX174-spezifische DNA-Probe (Fig. 44 B) zeigte, daß vor Temperaturerhöhung (*Spur 1*) keine spezifische mRNA nachgewiesen werden konnte. Erst 12 min nach Induktion (*Spur 2*) konnte $P_{L-GenD/E}$ -mRNA identifiziert werden.

Neben dem vollständigen Transkript von 761b konnte eine weitere mRNA-Spezies von 600b nachgewiesen werden. Die Intensität des intakten Transkripts war im Vergleich zur kürzeren mRNA ungefähr 3mal höher (*Spur 2*). Nach Blockierung der weiteren Transkription durch Rifampicin (*Spur 3 und 4*) konnte der Abbau des intakten Transkripts und das Auftreten kürzerer mRNA-Fragmente deutlich verfolgt werden. Zusätzlich traten weitere mRNA-Spezies mit Größen von 420b, 340b, 220b, 160b und 140b (*Spur 3 und 4*) auf, die als weitere Abbauprodukte des intakten Transkripts angesprochen werden konnten. Es erfolgte dabei eine Abnahme des vollständigen Transkripts zugunsten kürzerer mRNA-Fragmente. Da sowohl die Intensität der 761b mRNA als auch der 600b mRNA reduziert wurde, konnte davon ausgegangen werden, daß die 600b mRNA nur ein Intermediat in der Prozessierung der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA darstellt.

Bei Transkription von $P_{L-GenD/E}$ -mRNA in Gegenwart von *pxlA* in *E. coli* pop2135(pGH36pGH81) wurden 12 min nach Induktion ebenfalls zwei mRNA-Spezies nachgewiesen (Fig. 44, *Spur 6*), deren Intensität jedoch wesentlich schwächer als in pop2135(pGH36). Die Größen der mRNA wurden mit 761b und 600b bestimmt und waren somit mit den mRNA-Klassen, die im normalen zellulären Hintergrund in pop2135(pGH36) gebildet werden, identisch. Auch unter Einfluß von *pxlA* war der Gehalt an intaktem Transkript (761) vor Zugabe von Rifampicin höher als der kürzeren 600b mRNAs (*Spur 6*).

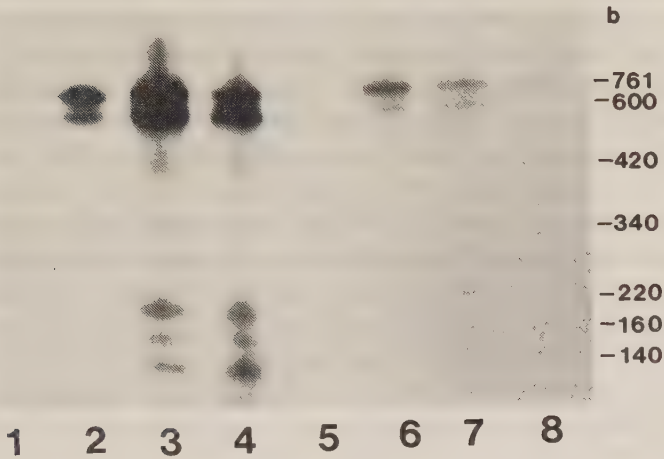


Fig.44 A Northernblot-Analyse von $P_{L-GenD/E}$ -mRNA und Einfluß der klonierten *pxlA*-Sequenz von Plasmid pGH81 auf die Gen D/E-spezifische mRNA in Gegenwart von Rifampicin

E. coli pop2135(pGH36) (Spur 1-4) und pop2135(pGH36pGH81) (Spur 5-8) wurden bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,8 bei 28°C angezogen und die P_{L-} -spezifische Transkription durch Temperaturerhöhung auf 42°C induziert. 12 min nach Induktion wurde die weitere Transkription durch Zugabe von Rifampicin (200 µg/ml) inhibiert. Gesamt-RNA wurde aus *E. coli* pop2135(pGH36) zu den Zeitpunkten $t = 0$ (Spur 1), 12 (Spur 2), 17 (Spur 3) und 22 min (Spur 4) ebenso wie aus *E. coli* pop2135(pGH36pGH81) zu den Zeitpunkten $t = 0$ (Spur 5), 12 (Spur 6), 17 (Spur 7) und 22 min (Spur 8) isoliert und eine Northernanalyse mit einer ^{32}P -markierten DNA-Sonde 1 (Fig.44 B) durchgeführt.

Die 761b mRNA stellt das intakte Transkript und die kleineren mRNA-Spezies die resultierenden Abbauprodukte dar. Die Größen der mRNA-Klassen wurden über die 23S, 16S und 5S rRNA als Längenstandard bestimmt.

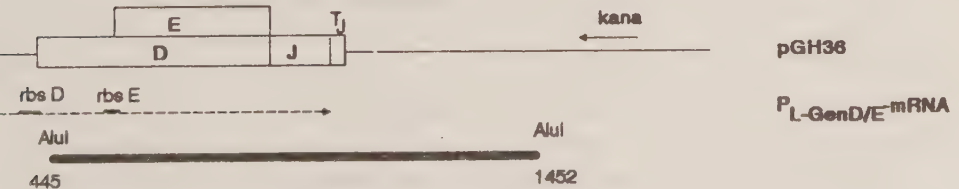


Fig.44 B PhiX174 Sequenz-spezifische Hybridisierungssonde

Die Plasmidkarte von pGH36 ist mit der PhiX174-spezifischen Hybridisierungssonde (Nukleotid 445-1452 des PhiX174-Genoms nach Sanger et al. 1978) dargestellt.

Nach Zugabe von Rifampicin konnte ebenfalls wie in der Wildtypsituation eine gleiche Verteilung des Gehalts dieser mRNA-Spezies gefunden werden (*Spur 7*). Kürzere mRNA-Fragmente von 220b, 180b und 150b traten unter Einfluß von **pxIA** mit wesentlich größerem Anteil an der Gesamt-mRNA schon vor Inhibierung der Transkription (*Spur 6*) auf als in *E. coli* pop2135(pGH36) (*Spur 2*). Auch erfolgte eine stärkere Abnahme des Gesamt-RNA-Gehalts, insbesondere kleinerer mRNA-Fragmente, die 10 min nach Transkriptionsinhibierung (*Spur 8*) nicht mehr identifiziert werden konnten.

Die Initiation der Prozessierung scheint mit dem Abbau des intakten Transkripts durch eine endonukleolytische Spaltung, wodurch ein verkürztes mRNA-Fragment (600b) entsteht, zu beginnen. Durch weitere Prozessierung der mRNA entstehen weitere, verkürzte mRNAs (420b, 340b, 220b, 160b, 140b).

F. Wachstumsabhängige Stabilität der Gen E-spezifischen mRNA in *E. coli* pxl^+

Die Konzentration vieler zellulärer Proteine verändert sich bei Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit (Pederson et al., 1978). Wachstumsabhängige Genregulation kann sowohl auf transkriptionaler wie translationaler Ebene stattfinden. Ein weiteres wichtiges Element der Genregulation stellt die Stabilität der mRNA dar. Nilsson et al. (1984) konnten zeigen, daß die Wachstumsgeschwindigkeit Einfluß auf die Stabilität mancher mRNAs (ompA, cat) hat. Der Abbau von mRNA war jedoch unabhängig von ihrer Sekundärstruktur. Es wurden Mechanismen vermutet, die die Abbauraten von Transkripten durch zelluläre Nukleasen beeinflussen. Charakterisierung phagenspezifischer mRNA-Spezies von M13 und f1 haben gezeigt, daß die mRNA durch eine zelluläre Aktivität prozessiert wird und die Prozessierungsrate möglicherweise vom physiologischen Zustand (Wachstumsrate) der Zellen abhängig ist (Smits et al. 1980, Blumer und Steege 1984).

Die Gen E Produkt-induzierte Lyse von *E. coli* ist abhängig vom Wachstumsstadium und von einem aktiven autolytischen System der Zellen (Lubitz et al., 1984a, b). Nach Infektion von Zellen in stationärer Phase mit Φ IX174 werden intrazellulär Phagen gebildet, die Lyse der Zellen ist jedoch inhibiert (Lubitz et al., 1984 a). Bläsi (1987) zeigte, daß nach Expression von kloniertem Gen E (pSB12) in Zellen in stationärer Wachstumsphase die Lyse verhindert ist, obwohl stabiles, funktionell intaktes Protein E gebildet wird; erst nach einem Wachstumsimpuls, der durch Verdünnen des Mediums gegeben wurde, lysierten die Zellen. Die Lyse erfolgte dabei auch in Gegenwart von Inhibitoren der Transkription und der Translation. Die Lyserate war dabei jedoch im Vergleich zu Zellen, die Gen E in exponentieller Wachstumsphase exprimieren, stark reduziert (Bläsi 1987). Der Einfluß der Wachstumsphase von *E. coli* Wildtyp-Zellen auf die Protein D- und Protein E-Synthese und die Stabilität der $\text{P}_{\text{L-GenE}}$, $\text{P}_{\text{L-GenD/E}}$ -mRNA wurden untersucht.

1. Nachweis von Protein D und Protein E nach Expression von Plasmid pGH36 in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von *E. coli*

Durch Nachweis der plasmidkodierten Genprodukte D und E in Zellen in stationärer Wachstumsphase sollte geklärt werden, ob neben der funktionellen Stabilität von Protein E auch eine Anhäufung von Protein E nach längerer Genexpression eintritt. Radioaktive ^{35}S -Methionin-Markierung der 25 min nach Induktion der Expression von λ P_{L} vom Plasmid pGH36 gebildeten Genprodukten von *E. coli* pop2135 in exponentieller und stationärer Wachstumsphase sollte einen quantitativen Vergleich der Proteine D und E geben (Fig.45).

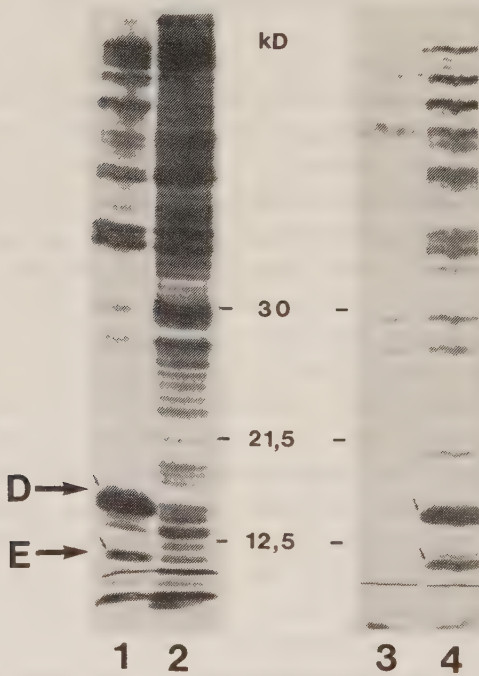


Fig.45

Einfluß der Wachstumsphase auf die Protein D- und Protein E-Synthese in *E. coli* pop2135(pGH36)

Autoradiogramm des Proteinmusters ^{35}S -Methionin markierter Proteine von *E. coli* pop2135(pGH36) in exponentieller und stationärer Wachstumsphase. *E. coli* pop2135(pGH36) wurde in DM-Medium bis zur angegebenen O.D.₆₀₀ angezogen. In einem Teil der Kultur wurde die Wachstumstemperatur auf 42°C erhöht, nach 5 min wurden die Zellen mit ^{35}S -Methionin (10μCi) markiert und für 25 min weiterinkubiert. Der Eintritt der Lyse erfolgte bei einer exponentiell gewachsenen Kultur etwa 35 min (O.D.₆₀₀ von 0,8) nach Genexpression.

Spur 1:	pop2135(pGH36)	42°C	O.D. ₆₀₀ 0,5
Spur 2:	pop2135(pGH36)	28°C	O.D. ₆₀₀ 0,5
Spur 3:	pop2135(pGH36)	28°C	O.D. ₆₀₀ 1,5
Spur 4:	pop2135(pGH36)	42°C	O.D. ₆₀₀ 1,5

Das Molekulargewicht (kD) der Markerproteine und die Position von Protein D (D) und Protein E (E) sind gekennzeichnet.

Im Proteinmuster von Zellen, in denen die Induktion der Gen D- und E-Expression vom Plasmid pGH81 in exponentieller (*Fig.45, Spur 1*) oder in stationärer Phase (*Spur 4*) erfolgt war, wurden gleiche Mengen von Protein E gefunden. Ebenso war die Menge an synthetisiertem Protein D in stationärer Phase gleich der in exponentieller Wachstumsphase. Das stöchiometrische Verhältnis der Proteine D und E untereinander schien ebenfalls unverändert zu sein. Obwohl Zellen in stationärer Phase nicht lysierten, war die Expression von Protein E nicht erniedrigt; eine erhöhte intrazelluläre Protein E-Konzentration konnte jedoch nicht festgestellt werden. Es blieb somit weiter unklar, wie die Regulation der Gen E- und Gen D-Expression in exponentieller und stationärer Phase gesteuert wird. Die P_L-spezifischen Transkripte in Zellen in exponentieller und stationärer Wachstumsphase wurden daher untersucht.

2. Nachweis der P_L-GenE-mRNA in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von E. coli

2.1. Kinetik der P_L-GenE-mRNA in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von E. coli

Der Nachweis von P_L-GenE-spezifischer mRNA nach Induktion der Gen E-Expression in E. coli pop2135(pSB12) erfolgte durch Northernanalyse (*Fig.46*). Aus induzierten Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und gegen eine DNA Probe mit Gen E-spezifischen Sequenzen (*Fig. 46 B*) hybridisiert. Der Verlauf und das Auftreten erster P_L-GenE-mRNA nach Induktion der Transkription wurde durch zeitabhängige Probenentnahme ermittelt.

Von Lambda P_L ausgehend ist von Plasmid pSB12 die Synthese einer 663 Nukleotid langen mRNA möglich, die am PhiX174-spezifischen Terminator T_J endet. Gen E-spezifische mRNA mit einer intakten Transkriptlänge von 663b konnte 6 min nach Induktion nachgewiesen werden (*Fig.46, Spur 3*). Die Intensität dieses Transkripts im Autoradiogramm nahm 9 min nach Induktion (*Spur 4*) um das 10fache zu, was auf ständige Transkription der spezifischen mRNA von Lambda P_L zurückzuführen war. 6 min nach Induktion (*Spur 3*) wurde eine weitere mRNA von 490b und nach 9 min (*Spur 4*) eine mRNA von 340b identifiziert. Die Intensität der hybridisierten Banden im Autoradiogramm blieb während des weiteren Versuchsverlauf bis 20 min nach Induktion der Transkription fast konstant (*Spur 4-7*). Ungefähr 70% der gesamten nachweisbaren Gen E-spezifischen mRNA bestanden aus intaktem Transkript von 663b. Durch ständige Transkription von Lambda P_L stieg der Gehalt der Gen E-spezifischen mRNA bis zum Eintritt der Lyse 15 min (bei O.D.₆₀₀ von 0,8) nach Temperaturerhöhung an. Das Auftreten kürzerer Transkripte oder Transkript-Fragmente, die ebenfalls nach Induktion, jedoch mit einer wesentlich geringeren Intensität auftraten, war auf eine Prozessierung des Intakten Transkripts von 663b zurückzuführen.

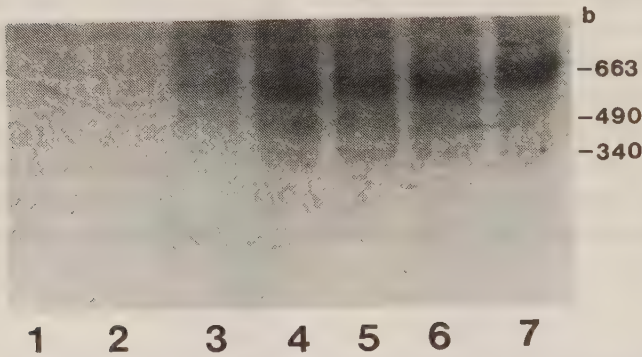


Fig.46 Nachweis P_{L-GenE} -spezifischer mRNA in exponentieller Wachstumsphase von *E. coli*

A. Autoradiogramm der Northernblotanalyse P_{L-GenE} -mRNA in exponentieller Wachstumsphase von *E. coli* pop2135(pSB12)

E. coli pop2135(pSB12) wurde bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,8 bei 28°C angezogen, und die Inkubationstemperatur der Kultur auf 42°C erhöht. Zum Zeitpunkt $t = 0$ (Spur 1), 3 (Spur 2), 6 (Spur 3), 9 (Spur 4), 12 (Spur 5), 15 (Spur 6) und 20 min (Spur 7) nach Induktion wurden je 5 ml Proben entnommen, Gesamt-RNA präpariert und die RNA unter denaturierenden Bedingungen im 6 M Harnstoff-Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer der RNA auf eine Gene-Screen-Membran wurde der Blot gegen eine spezifische DNA-Probe (B.) hybridisiert, die Gen E-Sequenzen von Nukleotid 572-968 des PhiX174-Genoms (Sanger et al., 1978) umfaßt. Die Größenbestimmung der mRNAs erfolgte über die 23S, 16S und 5S rRNA als Längenstandard.



B. Dargestellt ist eine vereinfachte Karte des Plasmids pSB12 und das Restriktionsfragment, das als Hybridisierungssonde eingesetzt wurde. Die Nukleotidpositionen auf dem PhiX174-Genom (nach Sanger et al., 1978) sind angegeben.

Analog zum Hybridisierungsexperiment mit exponentiell wachsenden Zellen wurden Northernblotanalysen von Zellen in stationärer Wachstumsphase durchgeführt (Fig. 47).

Im Autoradiogramm trat 10 min nach Induktion der Transkription erste Gen E-spezifische mRNA auf (Fig. 47, Spur 2). Neben dem 663b Transkript konnte die schon in exponentiell gewachsenen Kulturen identifizierten mRNAs von 490b und 340b nachgewiesen werden. Die Intensitätsverteilung der Banden unterschied sich jedoch wesentlich von der in der exponentiellen Wachstumsphase der Zelle ermittelten. Nach 15 min (Spur 3) erhöhte sich der Gehalt der mRNA-Spezies von 663b und 490b mit fast gleicher Intensität. Nach verlängertem Wachstum bei 42°C (20 und 25 min) trat eine Konzentrationsabnahme des längsten Transkripts von 663b ein, wogegen der Gehalt der 490b und 340b mRNA im weiteren Verlauf fast konstant blieb (Spur 4 und 5).

Die Analyse von P_{L-GenE}-mRNA zu gleichen Zeitpunkten nach Transkriptionsinduktion zeigte, daß in stationären Zellen im Vergleich zu exponentiell gewachsenen Kulturen vermehrt kürzere mRNAs entstehen.

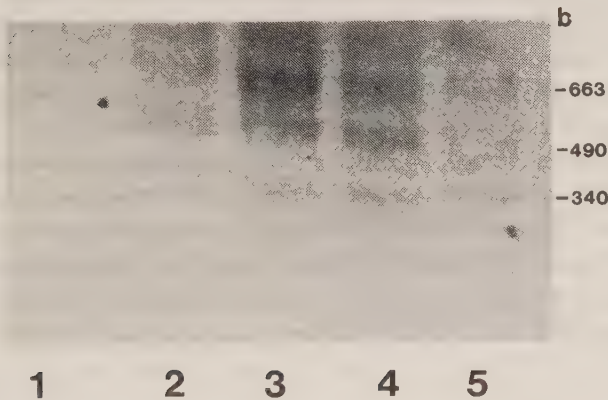


Fig. 47 Northernanalyse von P_{L-GenE}-mRNA in stationärer Wachstumsphase von *E. coli* pop2135(pSB12)

E. coli pop2135(pSB12) wurde bis zur stationären Wachstumsphase (O.D.₆₀₀ 1,5) in Vollmedium angezogen, die Temperatur auf 42°C erhöht und zu den Zeitpunkten $t = 0$ (Spur 1), 10 (Spur 2), 15 (Spur 3), 20 (Spur 4) und 25 min (Spur 5) nach Induktion Gesamt-RNA isoliert. Nach Auftrennen der RNA im denaturierenden Harnstoff-Agarosegel und Transfer auf Gene-Screen-Plus-Membranfilter erfolgte die Hybridisierung gegen die spezifische DNA-Probe (Fig. 46 B), die Gen E-Sequenzen von Nukleotid 562-968 des PhiX174-Genoms (Sanger et al., 1978) umfaßt.

Inwieweit das erhöhte Auftreten von kleineren mRNAs aus einer verstärkten Prozessierung des intakten Transkripts resultierte, sollte durch Analyse der mRNA-Klassen nach Inhibierung der Transkription erfolgen.

Dazu wurde die von Plasmid pGH36 transkribierte P_{L-GenD/E}-mRNA ausgewählt, da i.) ein direkter Vergleich von gebildeten Transkripten zu den synthetisierten Proteinen D und E (Fig.45) zu einem definierten Zeitpunkt erfolgen konnte, ii.) ein Vergleich der Transkriptionsklassen der P_{L-GenD/E}-mRNA in *pxlA* Mutanten (Kapitel C Fig. 21) möglich war.

2.2. Nachweis einer erhöhten Prozessierung von P_{L-GenD/E}-mRNA in stationärer Wachstumsphase von *E. coli*

Falls in Zellen mit stationärer Phase eine erhöhte Prozessierung von P_{L-GenE}-Transkript stattfand, so sollte nach Inhibierung der Transkription eine erhöhte Abbaurate des intakten Transkripts erfolgen.

Die intakte P_{L-GenD/E}-mRNA mit 761b konnte sowohl in pop2135(pGH36) in exponentieller als auch stationärer Phase ebenso wie das 600b Transkript-Fragment nachgewiesen werden (Fig.48).

In beiden Systemen konnte kein qualitativer Unterschied der aufgetretenen mRNA-Klassen festgestellt werden. Allerdings erfolgte eine quantitative Verschiebung der verschiedenen mRNAs dahingehend, daß P_{L-GenD/E}-mRNA in stationären Kulturen von *E. coli* (Fig.48, Spur 7 und 8) wesentlich schneller abgebaut wurde als in exponentiell gewachsenen Zellen (Fig.48, Spur 3 und 4).

Eine erhöhte Prozessierung von P_{L-GenD/E}-mRNA, die schon unter Einfluß von *pxlA* festgestellt wurde, erfolgte somit auch in Zellen in stationärer Phase. Die Zuordnung der Größenklassen der gefundenen mRNA-Spezies scheint den Schluß zuzulassen, daß unter den untersuchten Bedingungen (*pxl*⁺, *pxlA*, exponentielle und stationäre Wachstumsphase) qualitativ gleiche mRNA-Klassen entstehen, jedoch abhängig von zellulären Faktoren (*pxlA*, stationäre Phase) eine quantitative Verschiebung zugunsten prozessierter mRNAs erfolgt.

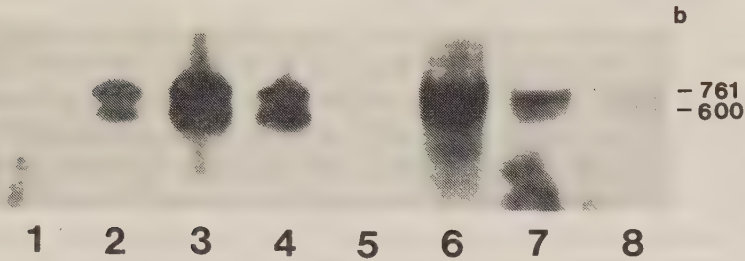
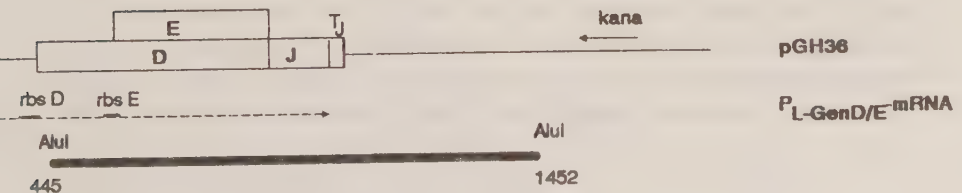


Fig.48 Northernblotanalyse der Synthese und des Abbaus von P_{L-GenD}/E -mRNA in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von *E. coli* pop2135(pGH36)

A. Gesamt-RNA wurde aus *E. coli* pop2135(pGH36) in exponentieller (Spur 1-4) und stationärer Wachstumsphase (Spur 5-8) zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktion der Transkription und nach Blockierung der Transkription durch Rifampicin (200µg/ml) isoliert und eine Northernblotanalyse mit einer ^{32}P -markierten DNA-Sonde (**B.**) durchgeführt. Die 761b-mRNA stellt das intakte Transkript und die kleineren mRNA-Spezies die resultierenden Abbauprodukte dar. Die Größen der mRNA-Klassen wurden über die 23S, 16S und 5S rRNA als Längenstandard bestimmt.

Spur 1:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 0,5	28 ⁰ C	t = 0 min
Spur 2:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 0,5	42 ⁰ C	t = 12 min
		Zugabe von Rifampicin (200µg/ml)		
Spur 3:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 0,5	42 ⁰ C	t = 17 min
Spur 4:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 0,5	42 ⁰ C	t = 22 min
Spur 5:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 1,5	28 ⁰ C	t = 0 min
Spur 6:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 1,5	42 ⁰ C	t = 12 min
		Zugabe von Rifampicin (200µg/ml)		
Spur 7:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 1,5	42 ⁰ C	t = 17 min
Spur 8:	pop2135(pGH36)	O.D. 600 1,5	42 ⁰ C	t = 22 min



B. Dargestellt ist eine vereinfachte Karte des Plasmids pGH36 und die Hybridisierungssonde (dicke Linie), die die Φ X174-Sequenz von Nukleotid 445-1452 des Φ X174-Genoms (Sanger et al., 1978) umfaßt.

G. Heterologe Expression von PhiX174 Gen E in *Staphylococcus carnosus*

Für die Lyse von *E. coli* durch das Protein E wurden bisher mehrere Vorschläge zur molekularen Ursache gemacht. Das favorisierte Modell schlägt die Integration von Protein E in die Zellhülle an sogenannten Adhäsionsstellen zwischen äußerer und innerer Membran und eine Ausbildung einer Tunnelstruktur durch Protein E-Oligomere, die beide Membranen durchspannt, vor (Witte und Lubitz 1988). Da grampositive Bakterien nur eine Membran besitzen, auf die ein mehrschichtiges (bis zu 50 Schichten) Murein gelagert ist, wurde das heterologe *Staphylococcus carnosus*-System gewählt, um den Einfluß von Protein E auf das Wachstum von grampositiven Bakterien zu untersuchen.

1. Klonierung von Gen E in den *E. coli* /*B. subtilis* "Shuttle"-Vektor pSI-I

Die Expression von Gen E in grampositiven Bakterien wurde unter die Kontrolle eines kontrollierbaren Hybridpromotors P_{spac} gestellt werden. In Plasmid pSI-I (Yansura und Henner 1984) ist dieser Promotor enthalten, der durch Fusion eines Promotors des *B. subtilis* Bakteriophagen SPO1 mit der Repressorbindungsstelle des *E. coli* lac-Operons konstruiert wurde. Die Steuerung der Expression P_{Spac} nachgeschalteter Gene erfolgt durch den *E. coli* lacI Repressor, der vom Plasmid pSI-I vom Promotor und der Ribosomenbindungsstelle des Penicillinase-Gens von *B. licheniformis* gebildet wird (Fig.50). Die Expression der unter der transkriptionellen Kontrolle von P_{Spac} klonierten Gene kann durch IPTG induziert werden.

Durch Plasmidanteile, die den Origin für gramnegative (pBR322) und grampositive Bakterien (UB110) enthalten, kann das Plasmid pSI-I in beiden Organismen-Gruppen replizieren. Das cat-Gen, das Chloramphenicol-Resistenz gegen 10µg/ml verleiht, wird ebenfalls in beiden Bakterien-Gruppen exprimiert.

Die Diskriminierung der Expression von heterologen Genen in *B. subtilis* erfolgt sowohl auf transkriptioneller als auch translationeller Ebene. Die Shine-Dalgarno-Sequenz von *E. coli* mRNAs bindet in grampositiven Bakterien mit geringerer Effizienz an die 16S rRNA als grampositive Shine-Dalgarno-Sequenzen (Band und Henner 1984). Daher wurde für die Expression von Gen E in grampositiven Bakterien die authentische Ribosomenbindungsstelle von Gen E gegen die pSIFIII-Ribosomenbindungsstelle (Band und Henner 1984) ausgetauscht.

1.1. Konstruktion von Plasmid pGH1

Zur Expression von Gen E mit einer spezifischen Ribosomenbindungsstelle für grampositive Bakterien in das Plasmid pGH1 wurde die Gen E Sequenz ohne eigene Shine-Dalgarno-Sequenz kloniert. Die Klonierungsstrategie ist in *Fig.49 und 50* dargestellt.

Da zur Abtrennung der Ribosomenbindungsstelle von der translatierten Gen E-Sequenz keine geeigneten Schnittstellen vorhanden waren, mußte die Konstruktion in mehreren Schritten durchgeführt werden, wobei das Hilfsplasmid pGH406 konstruiert wurde (*Fig.49*). PhiX174 RF-DNA wurde mit RsaI geschnitten und ein 196bp Fragment isoliert, das die PhiX174-Sequenz von Nukleotid 572-768 umfaßt (*Fig.49*). Durch den RsaI-Schnitt wurden jedoch das ATG-Startcodon und die ersten zwei Basenpaare des darauffolgenden Codons (GTA) entfernt. Um die 3'-Sequenzen von Nukleotid 768-842 von Gen E zu ersetzen, wurde zudem PhiX174 RF-DNA mit HaeIII verdaut und das 310bp Fragment von Nukleotid 669-979 isoliert. Zur Rekonstitution der fehlenden Basenpaare am 5'-Ende von Gen E wurde ein synthetischer SphI-Linker an die Fragment-Enden des 196bp-RsaI- sowie des 310bp-HaeIII-Fragments ligiert. Beide Fragmente wurden mit TaqI nachverdaut und erneut ligiert. Das daraus resultierende DNA-Fragment hatte eine Ingesamte Länge von 416bp und umfaßte die vollständige Gen E-Sequenz von Nukleotid 568-976.

Durch die Anheftung der SphI-Linker an das 5'-Ende der verkürzten Gen E-Sequenz konnte sowohl das ATG-Startcodon als auch die ersten 2 Basenpaare des folgenden Codons ersetzt werden. Dabei ergab sich jedoch für Codon 2 ein Basenaustausch von GTA (Val) nach CCA (Pro).

Zur weiteren Amplifikation wurde das konstruierte 416bp-Fragment in die SphI-Schnittstelle des Vektors pBR322 einkloniert. Durch Restriktionsverdau des neu entstandenen Plasmids pGH406 (*Fig.50*) wurde das SphI-Fragment nachgewiesen und die korrekte 5'-seitige Anbindung des SphI-Linkers durch Sequenzierung bestätigt.

Die Repression unter P_{SpecI} klonierter Gene durch das lacI-Genprodukt des Plasmids pSI-I ist nicht vollständig, da auch ohne Induktion schwache Hintergrundexpression anderer Gene nachgewiesen wurde (Yansura und Henner 1984). Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Klonierungsschritte in *E. coli* Cal^{q1} durchgeführt. *E. coli* Cal^{q1} trägt auf dem F'-Episom ein mutiertes lacI-Gen, dessen Expression zur 100fachen Überproduktion von lacI-Repressormolekülen führt.

Zur Inserierung von Gen E in den *E. coli*/B. subtilis "Shuttle"-Vektor wurde pSI-I mit SphI linearisiert und das 416bp-SphI-Fragment aus pGH406 mit T4-Ligase kovalent gebunden (*Fig.50*). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* Cal^{q1} transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit 10µg/ml Chloramphenicol bei 37°C. Erst nach 4-5 Tagen wurden Transformanten erhalten. Die Analyse der Klone erfolgte durch Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit SphI. Zur Bestimmung der Orientierung des 416bp-GenE-DNA-Fragments wurde Plasmid-DNA von Transformanten mit den Restriktionsenzymen BstNI, HaeIII, TaqI und PstI verdaut (*Fig. 51*). Plasmide mit der erwünschten Orientierung (Gen E in sense zur rbs) wurden mit pGH1 bezeichnet.

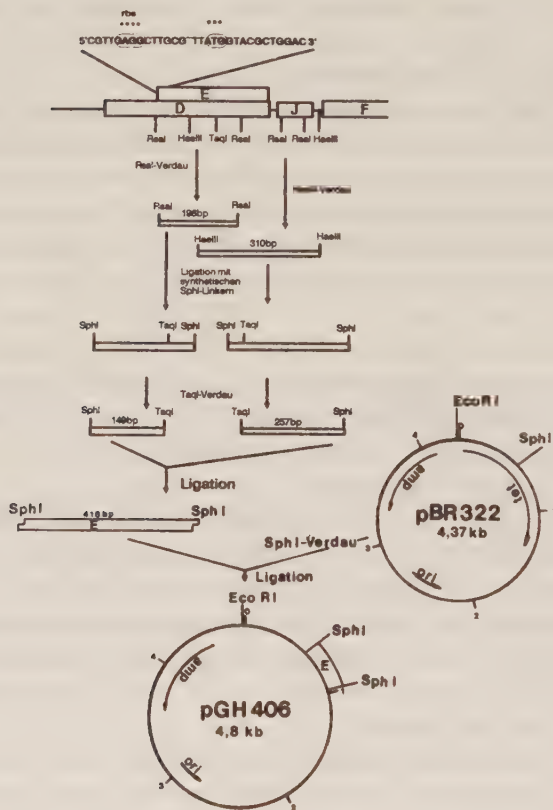


Fig. 49 Konstruktion von Plasmid pGH406

Das PhiX174-Genom mit einem Ausschnitt des Gen D, E, F und J umfassenden Bereichs ist dargestellt. Die Sequenz von Nukleotid 548-580 (Sanger et al., 1978) ist mit der Shine-Dalgarno-Sequenz (rbs ****) und dem Startcodon ATG (***) von Gen E angegeben. Die Konstruktion, die von PhiX174 RF-DNA ausgehend durchgeführt wurde, wird im Text beschrieben.

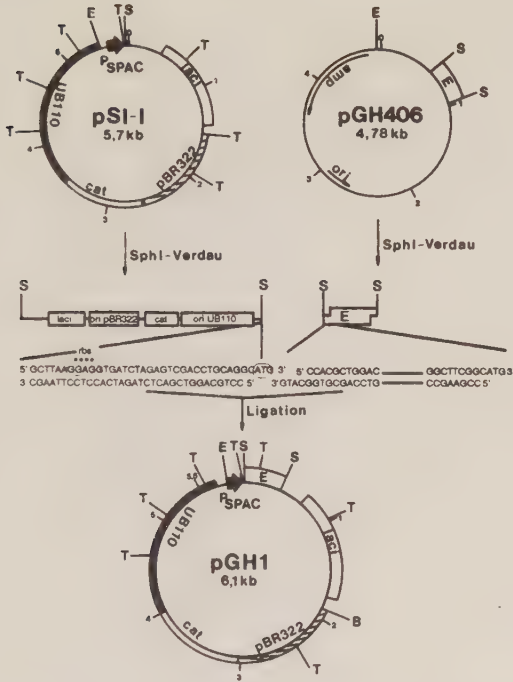


Fig. 50 **Konstruktion von Plasmid pGH1**

Die Plasmidkarte von pSI-1 und pGH406 mit den für die Klonierung von Gen E in den "Shuttle"-Vektor pSI-1 relevanten Restriktionsschnittstellen für *TaqI* (T), *SphI* (S) und *EcoRI* (E) ist dargestellt. Nach *SphI*-Restriktionsverdau von Plasmid pGH406 wurde ein 416bp *SphI*-Fragment, das die vollständige Gen E-Sequenz enthielt, isoliert und in die *SphI*-Schnittstelle von Plasmid pSI-1 ligiert. Die Nukleotidsequenz am 5'-Ende von Gen E des Plasmids pGH1 ist für den Übergangsbereich Vektor-DNA- Gen E-Sequenz dargestellt. Die Translationsinitiationssignale der Shine-Dalgarno-Sequenz (rbs****) und des Startcodons ATG (****) von Gen E sind gekennzeichnet.

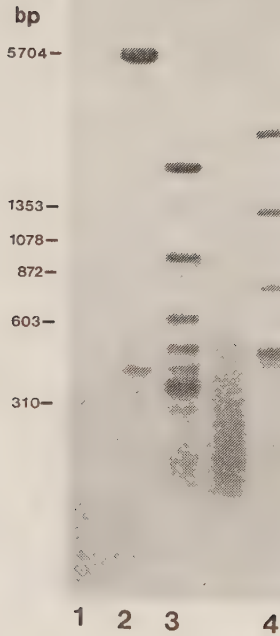


Fig.51 Restriktionskartierung des Plasmids pGH1

Als Marker wurde in der nachfolgenden Kartierung *Hae*III-verdaute *Phi*X174 RF-DNA mit den Fragmentgrößen 1353, 1078, 872, 603, 310, 278, 274, 234, 194, 118 und 72 (Spur 1) verwendet. Nach Restriktionsverdau von pGH1 Plasmid-DNA wurde die DNA auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. DNA-Fragmente mit Größen von 5704 und 416 wurden nach Verdau mit *Sph*I (Spur 2), mit Größen von 1874, 1057, 650, 522, 434, 397, 360, 350, 300, 98, 18, 11 nach *Hae*III- (Spur 3) und mit 2341, 1348, 807, 512, 500, 450 und 155 nach *Taq*I- (Spur 4) erhalten. Das 416bp-Fragment nach *Sph*I-Verdau gab die positive Inserierung von Gen E in Plasmid pSI-I an. Der Verdau mit *Taq*I lieferte ein 807bp und mit *Hae*III ein 1874bp DNA-Fragment, das die Orientierung von Gen E zum *P*_{spac}I in Plasmid pGH1 festlegt.

2. Expression von Gen E vom Plasmid pGH1 in *E. coli* und *Staphylococcus carnosus*

Mehrere Einzelkolonien von *E. coli* Calq¹(pGH1) wurden für die Expression von Gen E getestet. Die Kolonien wurden bei 37°C in LB-Medium bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,2 angezogen und die Gen E-Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 5mM) induziert.

Die Klone zeigten nach Induktion heterogenes Wachstumsverhalten; Vier von sechs Calq¹(pGH1)-Klonen wiesen reduziertes Wachstum im Vergleich zur nicht-induzierten Kultur auf und hatten eine Generationszeit von 60-70 min; ein Wachstumsstillstand oder Lyse konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Lyse von *E. coli* durch das Gen E Produkt ist abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen (Lublitz et al., 1984a). Es wurde daher vermutet, daß durch die verringerte Wachstumsgeschwindigkeit auch die Protein E Wirkung gehemmt war. Die Transformanten wurden zur Steigerung der Wachstumsrate in Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI, Difco) angezogen und die Expression durch Zugabe von IPTG (5mM Endkonzentration) induziert. Obwohl die Generationszeit auf 40 min erniedrigt war, konnte kein eindeutiger Einfluß der Gen E-Expression auf das Wachstum der Zellen beobachtet werden. Die Wachstumsrate von Transformanten, die einen Tag zuvor noch inhibiertes Wachstum nach IPTG-Zugabe gezeigt hatten, näherte sich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit vielmehr der der nicht-induzierten Kultur an.

Für dieses phänotypische Verhalten von *E. coli* Calq¹ boten sich mehrere Erklärungen an: i.) Gen E wird vom Plasmid pGH1 in *E. coli* Calq¹ nicht exprimiert, ii.) Gen E wird nur in subletalen Konzentrationen gebildet, iii.) Calq¹(pGH1)-Klone traten erst 4-5 Tage nach Transformation auf. Durch Hintergrundexpression von Gen E, die trotz Überproduktion von lacI nicht ganz ausgeschlossen werden kann, konnte es sich bei den Transformanten um bereits lyseresistente Mutanten handeln.

Durch Transformation von Plasmid pGH1 in die *E. coli* Stämme HB101, JM83, K12 Δ trp Δ H1 und PC2284, die keine lacI-Repressor-Überproduktionsfunktion besitzen, wurde die Transformations-effizienz des Ausgangsplasmids pSI-I und des rekombinanten Plasmids pGH1 überprüft. Bei Gen E-Expression ohne Repression sollte die Zahl von überlebenden Zellen deutlich gegenüber der Kontrolle (lacI-Repressor; Calq¹) erniedrigt sein. Die Transformationsraten sind in Tab.14 zusammengefaßt.

Die Transformationseffizienzen aller Stämme mit Plasmid pSI-I und pGH1 war im Verhältnis zur eingesetzten DNA sehr gering. Ein einheitliches Verhalten der Stämme nach Transformation mit Plasmid pGH1 konnte nicht festgestellt werden. Die Transformationsrate mit Plasmid pGH1 schwankte zwischen 5,5 und 65,5%. *E. coli* Cal^{q1}(pSI-I) und Cal^{q1}(pGH1)-Transformanten traten erst nach 72 h auf. Von den übrigen Stämmen konnten schon 14 h nach Ausplattieren Transformanten erhalten werden. Diese Transformanten wurden ebenfalls auf ihr Wachstumsverhalten nach Induktion von Gen E überprüft. Die Wachstumsrate aller plasmidhaltigen Stämme war im Vergleich zu den Wildtypzellen sowohl in Anwesenheit von Plasmid pSI-I als auch pGH1 von 30 auf 60 min reduziert.

Ein letaler oder lytischer Effekt nach Gen E Expression auf die Stämme Cal^{q1}(pGH1), K12ΔH1Δtrp(pGH1), JM83(pGH1) und PC2284(pGH1) konnte gegenüber den nicht-induzierten Kulturen nicht festgestellt werden.

Tab.14 Transformationseffizienz von *E. coli* Stämmen mit Plasmid DNA pGH1 und pSI-I

Stamm	Plasmid pSI-I cfu/ug DNA	Plasmid pGH1 cfu/ug DNA
Cal ^{q1}	292	54
K12ΔH1Δtrp	156	56
JM83	534	350
PC2284	2x10 ³	110

Die E. coli-Stämme wurden mit gleichen Mengen Plasmid-DNA von pSI-I und pGH1 transformiert und die Anzahl der Transformanten (cfu) pro ug DNA berechnet

Wenn auch die geringe Transformationseffizienz (Tab.14) für eine mögliche ungenügende Gen E-Repression sprach, so ließen sich die nachfolgenden Wachstumsversuche auch mit der Nicht-Expression von Gen E in den untersuchten Stämmen interpretieren. Zur Überprüfung der Situation bei grampositiven Bakterien wurden Protoplasten von *Staphylococcus carnosus* SA311 mit den Plasmiden pSI-I und pGH1 transformiert und auf DMM-Regenerationsplatten mit Chloramphenicol (10 ug/ml) ausplattiert. Die Expression von Gen E unter der Kontrolle von P_{spac} wurde in PH-Vollmedium bei 37°C (O.D.₆₀₀ 0,1-0,2) durch IPTG-Zugabe induziert (Fig.52 A).

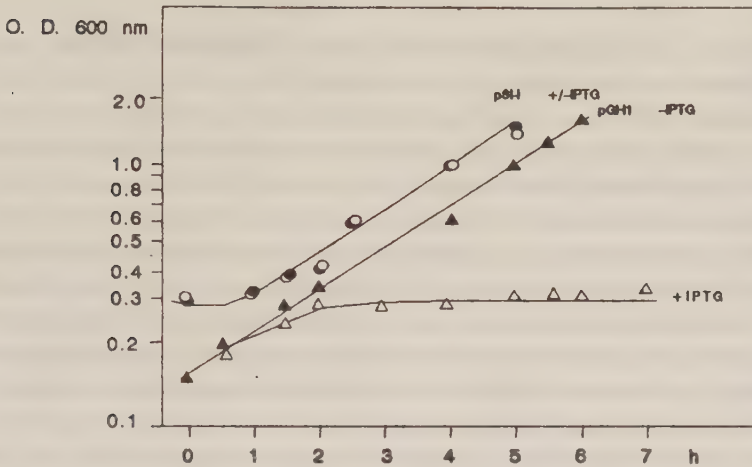


Fig.52 A Gen E-Expression vom Plasmid pGH1 in *Staphylococcus carnosus* SA311

Staphylococcus carnosus SA311(pSI-I) (●) und SA311(pGH1) (▲) wurden in Vollmedium bei 37°C in Gegenwart von 10 µg/ml Chloramphenicol angezogen. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurde zu je einem Teil von SA311 (pSI-I) (○) und SA311(pGH1) (△) 5 mM IPTG gegeben und der Verlauf der O.D.₆₀₀ verfolgt.

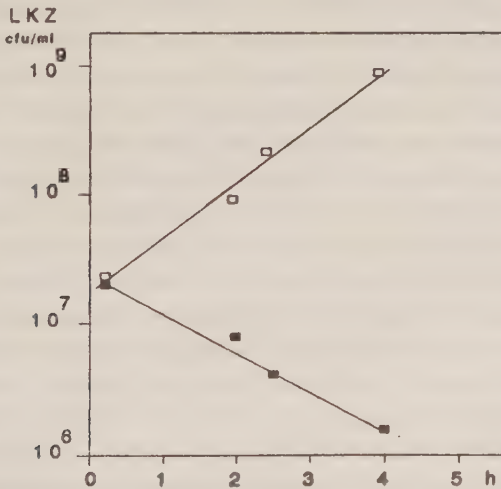


Fig.52 B Lebendkeimzahlbestimmung von SA311(pGH1) nach Induktion der Gen E-Expression

Je 0,1 ml Proben einer exponentiell wachsenden Kultur von *S. carnosus* SA311(pGH1) ohne (□) und mit (■) IPTG (5 mM) (Fig.52A) wurden zu den Zeitpunkten $t = 0, 2, 5$ und 4 h entnommen und eine Verdünnungsreihe erstellt. Nach Ausplattieren der Verdünnungsstufen auf PH-Platten (+ 10 µg/ml Chloramphenicol) und Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Kolonien ausgezählt. Die Lebendkeimzahl (L.K.Z.) wurde pro ml Kultur berechnet (cfu/ml).

Acht von zehn getesteten SA311(pGH1)-Klonen zeigten 2 h nach IPTG-Zugabe einen Wachstumsstillstand. Die Wachstumsrate der nicht-induzierten Kultur verhielt sich identisch zum Wachstumsverhalten von *S. carnosus* SA311(pSI-I). Die Induktion der Gen E-Expression hatte nicht nur einen drastischen Effekt auf das Wachstum der Zellen, sondern auch auf die Anzahl der Überlebenden. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl von *S. carnosus* SA311(pGH1) zeigte, daß etwa 95 % der Zellen 4 h nach Induktion der Gen E-Expression abgetötet waren (Fig.52 B).

Die letale Wirkung von Protein E auf *S. carnosus* SA311(pGH1)-Klone konnte mehrere Tage nach Transformation nicht mehr in dem Maße beobachtet werden, wie dies bei frisch transformierten Zellen (Fig.52 A) möglich war. Dieser Effekt konnte auf der Instabilität des Plasmids pGH1 beruhen, da aus *S. carnosus* SA311(pGH1)-Klonen Isolierte Plasmid-DNA zum Teil Deletionen und intramolekulare Umlagerungen zeigte. Ebenso war das Auftreten von resistenten Bakterien aufgrund einer schwachen Hintergrundexpression von P_{Spac} nicht völlig auszuschließen.

Die Versuche mit Plasmid pGH1 zeigten, daß eine heterologe Gen E-Expression möglich ist. Im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien übt Protein E auf grampositiveq Bakterien keinen lytischen, sondern einen letalen Effekt aus. Dieser Unterschied spricht für die Spezifität von Protein E, ein aufgrund seiner Struktur Zwei-Membranen-spannendes Protein zu sein (Witte und Lubitz 1988).

V. Diskussion

Zelluläre Einflüsse auf die Protein E-induzierte Lyse von *E. coli*

E. coli **lytA** Mutanten (Harkness und Ishiguro 1983) mit einem Defekt in einer Regulationsfunktion des autolytischen Systems zeigten bei restriktiver Temperatur nach endogener Induktion von Gen E und Behandlung mit Penicillin, D-Cycloserin oder Entzug von Diaminopimelinsäure (DAP) einen lysenegativen Phänotyp (Lubitz et al., 1984b) und bestätigten damit vorangegangene Untersuchungen (Lubitz et al., 1984a), daß die Gen E Produkt- und die Penicillin-induzierte Lyse gemeinsame zelluläre Voraussetzungen benötigen. Andererseits konnten Mutanten, die resistent gegen EDTA- oder Moenomycin-induzierte Autolyse sind (Leduc et al., 1984), durch Protein E lysiert werden (Halfmann et al., 1984). Es konnte daher nicht eindeutig geklärt werden, ob die Art der Lyseinduktion durch Gen E und durch Autolyse-induzierende Agenzien gleich ist, oder ob unterschiedliche regulatorische Funktionen der Autolysekaskade für beide Mechanismen gemeinsam notwendig oder unabhängig voneinander sind.

Die in dieser Arbeit untersuchte *E. coli* Mutante VC44 **lytB**, die gegen Penicillin-induzierte Autolyse bei restriktiver Temperatur tolerant ist (Shimmin et al. 1984), konnte nach Gen E-Expression vom Plasmid pUH123 durch Protein E lysiert werden. Die **lytB** Mutation betrifft damit keine essentielle Funktion der Gen E Produkt-induzierten Lyse von *E. coli*. Nach PhIX174-Phageninfektion zeigte *E. coli* VC44 **lytB** bei restriktiver Temperatur einen Wachstumsstillstand, wobei eine Phagenentwicklung unter diesen Bedingungen nicht festgestellt werden konnte. Nach Temperaturerniedrigung erfolgte die Lyse der Zellen erst, nachdem der inhibitorische Effekt auf die Phagenentwicklung aufgehoben worden war. Der Einfluß auf die Phagenreplikation wurde daher auf einen Sekundäreffekt der Mutation(en) oder auf eine bisher noch nicht beschriebene weitere Mutation von *E. coli* VC44 zurückgeführt. Obwohl eine Reihe von gemeinsamen Faktoren für die Penicillin- und Protein E-induzierte Lyse von *E. coli* beschrieben wurden, lassen die an der **lytB** Mutante durchgeführten Untersuchungen den Schluß zu, daß die Gen E Produkt- und Penicillin-induzierte Lyse keine gemeinsamen Wege der Autolysekaskade benutzen, sondern vielmehr gemeinsamen übergeordneten regulatorischen Funktionen der Zelle unterliegen.

Diese Feststellung wird durch Untersuchungen an PBP-Mutanten (Witte pers. Mittl.) unterstützt, die zeigten, daß **mrc**, **pbb** und **dac** Mutationen (Defekte in PBP 1-4) keinen Einfluß auf die Protein E-Lyse haben. In Zellen mit Defekten der membrangebundenen Endopeptidase (**mepA**, **mepB**) findet jedoch nur eine verzögerte Lyse statt, was darauf hindeutet, daß diese Zellfunktion möglicherweise für eine effektive Zellyse zusätzlich notwendig ist.

Die Zellelongation und die Zellteilung werden durch das **wee** Genprodukt koordiniert (De la Campa et al., 1984). In Abwesenheit von **wee** sind Zellen unabhängig vom Wachstum kürzer, ihre Zellmasse akkumuliert und sie sterben früher als ihre Parentalstämme. Induktion von Gen E nach Ausfall des

wee Genprodukts in *E. coli* OV25(pUH123) führte zu einer reduzierten Lyse der Zellen bei restriktiver Temperatur. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Reduktion der Lyserate in **wee** Mutanten auf einem Ausfall des **wee** Genprodukts beruhte oder auf dem reduzierten Wachstum der Zellen bei 42°C. Da die Lyse jedoch nicht vollständig inhibiert war, kann eher angenommen werden, daß das **wee** Genprodukt nicht zu den notwendigen zellulären Voraussetzungen der Gen E Produkt-induzierten Lyse von *E. coli* zählt.

Isolierung und Charakterisierung von *pxlA* Mutanten von *E.coli*

Nach Gen E Expression von rekombinanten Plasmiden konnten lysenegative Wirtsmutanten isoliert werden. Diese **pxl**-(PhIX-lysis) Mutanten zeigten auch in Anwesenheit von Lyseplasmiden, die Gen E von P_{lac} oder Lambda P_L konstitutiv exprimierten, normales Wachstumsverhalten. Morphologische oder physiologische Veränderungen der **pxl** Mutanten konnten im Vergleich zu den Parentalstämmen nicht nachgewiesen werden (Tab.2a,b).

Ebenfalls nach Gen E-Expression spontan aufgetretene Mutanten (**slyD**) wurden von Maratea et al. (1985) isoliert. Das **slyD** Allel ist rezessiv und wurde grob bei Minute 70-78 auf dem *E. coli* Chromosom kartiert. Dem **slyD** Genprodukt wurde die Spezifität einer Erkennungsstelle von Protein E in der Membran zugesprochen und die Lyse von **slyD** Mutanten durch Gen E-lacZ-Fusionen auf einen "by-pass" solcher Fusionsproteine gegenüber dem normalen Protein E-Mechanismus zurückgeführt. *E. coli pxtA* Mutanten lysierten ebenfalls nach Expression der Gen E-lacZ-Fusionen, wogegen sie nach Expression des Lysegens L des Phagen MS2 (Kastelein et al., 1983) und eines Gen E-Gen L-Fusionsgens (Harkness und Lubitz 1987) normales Wachstum zeigten (Daten nicht gezeigt).

Struktur der *pxlA*-Sequenz und ihrer genomischen Umgebung

Für die Resistenz gegen Protein E-induzierter Lyse von *E. coli* lassen sich mehrere Hypothesen aufstellen (Kapitel C.). Eine notwendige Zwischenwirkung von Protein E mit anderen Membranproteinen (**slyD**) wurde bereits angesprochen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, einen neuen Mechanismus näher zu charakterisieren. Ein Mutantendefekt (**pxlA**) wurde daher näher untersucht.

In einer Serie von Chromosomenübertragungen und P1-Transduktionen wurde der Genort von **pxlA** bei der Minute 83,3 kartiert (Bachmann 1983). In seiner genomischen Umgebung befinden sich die Gene für die DNA-Biosynthese-Initiation (**dnaNA** -0,3 min), für den Replikationsorigin des Chromosoms (**oriC** -0,6), für ribosomale Proteine (**rpmH** -0,2 min), für die Proteinkomponente der Ribonuklease P (**rnpA*** -0,6) und für eine veränderte Ribonukleaseaktivität (**stsA*** -0,4), sowie für eine Reihe von Genen für zelluläre Stoffwechsellleistungen.

Durch Klonierung eines 4,6 kb EcoRI/BamHI-Fragments chromosomaler DNA aus der *pxIA* Mutante GH56 in Plasmid pGH81, das die kodierenden Sequenzen für die Ausprägung von *pxIA* enthält, konnte jeder Wildtypzelle durch Transformation der *pxIA*-Phänotyp verliehen werden. Die zelluläre Expression von *pxl*⁺ reicht nicht für die Komplementation der mutierten *pxIA*-Sequenz aus. Dies wird durch Ergebnisse von F'-Faktorkreuzungsversuchen, bei denen die *pxIA* Mutation durch F'-Faktoren nicht komplementiert werden konnte, gezeigt. Die *pxIA* Mutation besitzt somit eine Dominanz über die Wildtyp *pxl*⁺-Funktion.

Das klonierte 4,6 kb DNA-Segment wurde mit chromosomaler DNA der Mutante GH56 und des Wildtyps JF448 rückhybridisiert, um Informationen zur Struktur des Gens und seiner genomischen Umgebung zu erhalten. Dabei zeigte sich, daß in Wildtypzellen ein 10 kb BamHI/EcoRI-Fragment mit der klonierten *pxIA*-Sequenz hybridisierte. Hybridisierungsversuche mit pLC-Plasmiden, die klonierte Bereiche des *E. coli* Chromosoms bei der Minute 83 beinhalten (Clark und Carbon 1976), ergaben ebenfalls Hybridisierungssignale von 10 kb. DNA-Bereiche des klonierten *pxl*⁺-Wildtypgenoms auf dem Plasmid pJF79 zeigten ein vollkommen anderes Restriktionsmuster als das klonierte *pxIA*-Segment. Dies deutete stark auf größere Veränderungen auf DNA-Ebene hin, möglicherweise Deletionen, Insertionen oder DNA-Rearrangements. Die genauere Bestimmung der molekularen Ursache der *pxIA* Mutation auf DNA-Ebene kann jedoch erst nach Sequenzanalysen des chromosomalen Abschnitts der Wildtyp- und der mutierten Sequenz erfolgen. Die Sequenzierung des für *pxIA* kodierenden DNA-Bereichs wird derzeit im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Molekulare Ursache der phänotypischen Resistenz von *pxIA* Mutanten nach Expression der letalen Gen E-Funktion

1. Gen E wird in *pxIA* Mutanten exprimiert

Auf dem PhiX174-Genom liegt Gen E vollständig innerhalb der Gen D Sequenz, wobei Gen E mit einer +1 Leserasterverschiebung zu Gen D translatiert wird. Beide Gene sind auf allen, von verschiedenen Promotoren aus transkribierten mRNA-Klassen enthalten (Hayashi et al., 1976) und kommen zusammen mit Gen J auf einer der häufigsten mRNA Klasse XIII vor. In infizierten Zellen werden ungefähr 200-250 reife Phagenpartikel gebildet, wobei pro Partikel etwa 80 Monomere D-Protein und 60 Monomere J-Protein benötigt werden (Tessman und Tessman 1973). Geht man von quantitativen Analysen des Verhältnisses der Protein D zur Protein E Konzentration, die ein molares Verhältnis von 10 Molekülen Protein D zu Protein E ergaben, aus (Pollock et al., 1978, Bläsi 1987), so werden etwa 1600-2000 Moleküle Protein E in infizierten Zellen synthetisiert. Die Genprodukte von D und J sind mit etwa 20,000 bzw 15,000 Molekülen vertreten. Die Regulation der unterschiedlichen Genexpression

dieser überlappenden Gene ist bisher noch nicht verstanden. Eine kotranslationale Kopplung der Gen D- und Gen E-Expression konnte nicht festgestellt werden (Bläsi 1987).

Mutationen der Wirtszelle, die Einfluß auf die Gen D- und E-spezifische mRNA haben, würden gleichzeitig auch die Expression beider Translationsprodukte beeinträchtigen. Direkte Einwirkung auf Protein E durch proteolytische Spaltung reduziert die Protein D-Synthese jedoch nicht.

Die Anordnung der Gene D, E und J, die auf dem Plasmid pSB35 unter der transkriptionellen Kontrolle von Lambda P_L kloniert wurden und über den *cls7*-Repressor kontrolliert exprimiert werden, ist mit der *in vivo* Situation auf dem PhIX174-Genom vergleichbar. Für den größten Teil der durchgeführten Untersuchungen wurde daher dieses Plasmid herangezogen.

Zur Ausprägung der Resistenz von *pxIA* Mutanten nach Gen E-Expression konnten mehrere zelluläre Veränderungen (Kapitel C) führen, die die Gen E-Transkription,-Translation oder den Wirkungsmechanismus von Protein E beeinträchtigen. In erster Linie sollte daher der Nachweis der Expression von Gen E in *pxIA* Mutanten erbracht werden.

Der Nachweis von Protein E in *pxIA* Mutanten war mittels SDS-PAGE nur sehr bedingt möglich. Durch Komplementationsanalysen mit PhIX174am3-Phagen konnte jedoch gezeigt werden, daß in Zusammenhang mit der Phagenreplikation eine Expression von Gen E vom Plasmid erfolgt und damit eine Komplementation der PhIX174 Gen Eam3-Mutation möglich war.

Aufgrund der wesentlich höheren Expression von Gen D gegenüber Gen E vom Plasmid pSB35 aus (Bläsi 1987) konnten durch Untersuchung der Expression von Protein D in *pxIA* Mutanten Rückschlüsse auf die Expression von Protein E gezogen werden.

In *pxIA* Mutanten wurden nur etwa 25% der in Wildtypzellen synthetisierten intakten Protein D- und E-Menge gefunden. Neben dem intakten Protein D wurde in fast gleichen molaren Mengen ein um etwa 6 Aminosäuren verkürztes Protein D'-Fragment nachgewiesen. Die Verkürzung des C-terminalen Bereichs von Protein D führt aufgrund der Überlappung zu Gen E gleichzeitig zu einem C-terminal um 5 Aminosäuren verkürzten Protein E. Deletionsstudien haben jedoch gezeigt, daß die 9 endständigen Codons von Gen E ohne Funktionsverlust deletiert werden können (Schüller et al., 1985). Die Ursache der Resistenz von *pxIA* Mutanten kann daher nicht allein auf der C-terminalen Verkürzung von Protein E beruhen. Vielmehr muß die Frage gestellt werden, wie es zu dieser Verkürzung des Proteins kommt und weshalb in den Mutanten die synthetisierte Menge sowohl an Protein D als auch an Protein E reduziert ist. Da die Synthese beider Genprodukte von der veränderten Wirtsfunktion beeinflusst wird, ist die Antwort eher auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene zu suchen.

-Die Transkription wird frühzeitig terminiert.

Gen E umfaßt auf dem PhIX174-Genom (Sanger et al., 1978) die Nukleotide 568-841. Von Axelrod (1976) wurde nach Analyse *in vitro* transkribierter PhIX174-mRNA ein Terminator T₂ bei Nukleotid 854 (Sanger et al., 1978) angenommen und durch Computervorhersagen von McMahon und Tinoco (1978) bestätigt. Zudem befinden sich im 3'-Bereich von Gen E an Position 763-776, 811-818 und

826-833 ausgeprägte Z-DNA-Strukturen. Diese Z-DNA-Strukturen stellen relativ schwache Substrate für die RNA-Polymerase dar und können zur Transkriptionstermination führen (Revet et al., 1984).

Falls die Transkriptionstermination der untersuchten $P_{L-GenD/E}$ -mRNA an T_2 enden würde, müßte sie in der untersuchten $P_{L-GenD/E}$ -mRNA jedoch mit geringerer Effizienz als die an T_J erfolgen, da zu Beginn der Genexpression in p_{xI}^+ - und p_{xIA} -Zellen nur Transkripte mit einer Länge von 761b gefunden wurden und damit an T_J terminierten (Fig.19, 21). Zu späteren Zeitpunkten der Transkription (Fig.19, 21) und nach Inhibierung der Transkription durch Rifampicin (Fig.42) wurde eine Abnahme des Gehalts an vollständigem Transkript (761b) in Wildtypzellen und eine Zunahme der intrazellulären Konzentration an kürzeren Transkripten -besonders eines 600b mRNA-Fragments- beobachtet.

-Die Transkription endet an T_J , intaktes Transkript wird synthetisiert, die mRNA wird posttranskriptional prozessiert.

Für die Φ X174 mRNA-Klasse XIII ist bekannt, daß sie im 3'-Bereich des Transkripts eine stem-loop-Struktur besitzt, die die Funktion eines Transkriptionsterminationssignals hat und gleichzeitig für die strukturelle und funktionelle Stabilität dieser mRNA verantwortlich ist (Hayashi und Hayashi 1985). Diese mRNA mit kleinen Veränderungen im 5'-Bereich wurde in dieser Arbeit weitgehend untersucht ($P_{L-GenD/E}$ -mRNA). Die Φ X174-mRNAs sind an Polyribosomen gebunden und werden kontinuierlich translatiert. Trotz dieser Bindung werden sie exponentiell zeitabhängig abgebaut (Hayashi et al., 1981b). Ist dieser Degradationsprozeß erst initiiert, so erfolgt er sehr rapide und endet in einem Totalabbau der mRNA. Der Abbau von Φ X174-mRNA scheint somit einen limitierenden Schritt einzuschließen, der der Beginn des Degradationsprozesses ist. Für den Abbauprozess wurde eine hypothetische mRNA 3'-5'Exonuklease verantwortlich gemacht, für die die 3'-stabilisierende hair-pin-Struktur als Barriere fungiert (Hayashi und Hayashi 1985).

Bisher wurden für die *in vivo* gebildeten Φ X174-mRNAs keine weiteren Anzeichen einer posttranskriptionalen Prozessierung nachgewiesen (Hayashi und Hayashi 1985). Allerdings gibt es schwache Hinweise, daß möglicherweise RNaseIII auf die Φ X174-mRNAs wirkt (Kapitza et al., 1976). Die von Hayashi und Hayashi (1981b) gemachte Beobachtung, daß nach Einsetzen des Degradationsprozesses auch in Anwesenheit von Rifampicin keine Veränderung der Größenverteilung von Φ X174-spezifischen mRNAs und Akkumulation von kleineren Fragmenten erfolgt, konnte für die untersuchte $P_{L-GenD/E}$ -mRNA nicht bestätigt werden, da in p_{xI}^+ -Zellen verschiedene mRNA-Fragmente von dieser mRNA gefunden wurden (Fig.26).

Analysen der nach Expression vom Plasmid pSB35 transkribierten $P_{L-GenD/E}$ -mRNA ergaben, daß in p_{xI}^+ - und p_{xIA} -Zellen intaktes Transkript von 761b synthetisiert wird. Die ermittelte Größe dieser mRNA bestätigt die von Hayashi et al. (1976) nach Analyse *in vivo* transkribierter Φ X174 mRNAs postulierte Termination an T_J und die durch die 3'-hair-pin-Struktur erwartete lange Lebensdauer dieser mRNA in Wildtypzellen.

Die qualitative Analysen der nach Induktion von Lambda PL-GenD/E-Vom Plasmid auftretenden mRNA-Klassen durch Hybridisierungsstudien zeigte, daß in pxl^+ -Zellen die Bildung von 5'- und 3'-terminal verkürzten mRNAs möglich ist, wobei der zelluläre Gehalt an intaktem Transkript von 761b jedoch überwiegt (Fig.26).

Clements und Sinsheimer (1975) fanden neben den 10 *in vivo* von Hayashi und Hayashi (1981b) nachgewiesenen PhiX174-mRNAs weitere acht mRNA-Spezies und schlossen bereits damals eine endonukleolytische Spaltung von längeren Transkripten nicht aus.

2. Posttranskriptionale Prozessierung der PL-GenD/E-mRNA in *E. coli*

Prozessierungsreaktionen, die regulatorische Effekte auf prokaryotische mRNAs haben, sind solche, die den mRNA-Umsatz ("turn-over") beeinflussen. Verschiedene mRNA-Spezies haben unterschiedliche Lebensdauer und synthetisieren daher verschiedene Mengen an Proteinen pro mRNA-Molekül (Van Gabain et al., 1983). Prozessierung und Umsatz von RNA kann jedoch nicht eindeutig in endonukleolytischen oder exonukleolytischen Angriff getrennt werden, da eine Reaktion sowohl die Reifung als auch die Destabilisierung der RNA auslösen kann.

Obwohl im allgemeinen Prozessierungsreaktionen neben dem "turn-over" von mRNAs in *E. coli* keine Bedeutung zugesprochen wurde, sind sie für die Regulation der Genexpression bei Phagen äußerst wichtig (King et al., 1986). Das Überleben und die Vermehrung von Phagen ist ein zeitliches Problem: Nach Infektion muß das Phagengenom mit genügender Effizienz exprimiert sein, bevor sich die Zelle durch die zelluläre Maschinerie des wirtseligen Restriktionssystems verteidigt. Da die bakterielle Genexpression hauptsächlich auf der Ebene der Transkriptionsinitiation reguliert wird, muß die Genexpression des Phagen schnell vollzogen werden. mRNA-Prozessierung steuert in den im folgenden dargestellten Fällen die unterschiedliche Expression, wobei die limitierenden Schritte in der Genexpression von der Transkription getrennt werden (Apirion 1984).

Während der T7-Phagen Infektion werden die frühen mRNAs als einzelne, lange Transkripte von einem multicistronischen Operon synthetisiert und posttranskriptional durch RNaseIII gespalten. Die Expression des 0.3 Gens von T7 ist vollkommen abhängig von dieser RNaseIII Prozessierung, da nicht-prozessierte mRNA die Ribosomenbindungsstelle dieser mRNA maskiert und die "burst-size" der Phagen herabgesetzt wird (Dunn und Studier 1973). Die Expression des *int* Gens des Phagen Lambda, das unter der Kontrolle des strukturellen RNA-Elements *slb* steht, wird durch die Ausbildung einer doppelsträngigen mRNA-Struktur, die eine RNaseIII Angriffsstelle enthält, vermindert (Court et al., 1983a,b).

In T4-Phagen erfolgt ein posttranskriptionales Spleißen des Thymidylat-Synthetase Gens als Mechanismus der Entfernung von Intronsequenzen im späten Stadium der Infektion (Belfort et al., 1985). Diese mRNA Spleiß-Reaktion wird auch ausgeführt, wenn das *td*-Gen in *E. coli* kloniert ist, und es wurde vermutet, daß *E. coli* ebenfalls die für den Spleißmechanismus notwendigen Informationen (z. B. RNA-Ligase) besitzt (Chu et al., 1984).

Für die zur Gruppe der einzelsträngigen DNA-Phagen mit zirkulärem Genom gehörenden Viren M13 und f1 konnte gezeigt werden, daß die mRNA-Prozessierungsergebnisse, die zu einer unterschiedlichen Regulation der Phagengene auf einer Transkriptionseinheit führen, durch die Aktivität einer noch unbekannten zellulären Nuklease gesteuert werden (Smits et al., 1980, Blumer und Steege 1984).

Die Transkription von PhIX174-mRNA erfolgt auch in sogenannten Transkriptionseinheiten, die mehrere Gene beinhalten. Alle PhIX174-mRNA-Klassen werden zu frühen und zu späten Zeitpunkten im Infektionszyklus gebildet, liegen jedoch in unterschiedlichen molaren Verhältnissen vor. Die Genprodukte werden ebenfalls in verschiedenen molaren Konzentrationen synthetisiert. Die Regulation der PhIX174 Genexpression ist jedoch bisher nur zum kleinen Teil verstanden (Bläsi 1987).

Da die Maschinerie dieser Prozessierungsreaktionen von Phagen-mRNAs durch das E. coli Genom kodiert werden, scheinen diese Mechanismen auch für E. coli signifikant zu sein. Die funktionelle Inaktivierung von mRNAs wird generell durch einen endonukleolytischen Schnitt als Initiationsreaktion angenommen.

Spezifische endonukleolytische Spaltung im 5'-3'-Bereich wurde für den Abbau der E. coli *trp* mRNA (Kano und Imamoto 1979), der *lac* mRNA (Cannistraro et al., 1986) und der *ompA* mRNA (Meleforts und van Gabain 1988) nachgewiesen. Neben Spaltung der *lac* mRNA durch RNaseIII wurden weitere Spaltungen in Regionen mit ausgeprägten Sekundärstrukturen durch noch unbekannte Nukleasen aufgezeigt (Cannistraro et al., 1986). Durch Bestimmung der Sequenzen der 3'- und 5'-Enden der Spaltprodukte konnten mehrere repräsentative Sequenzen festgelegt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Sekundär- und Tertiärstruktur des 3'-Bereichs der PhIX174-mRNA XIII und des PL-GenD/E-Transkripts (Nukleotid 550-680) durch zwei unabhängige Computerprogramme (Tinoco et al., 1973, Lang und Burger 1986) wiesen an der Position von 566-590 des PL-GenD/E-Transkripts eine ausgeprägte stem-loop-Struktur mit einer perfekten 7 Basenpaarung auf, wobei 4 davon GC Paarungen waren. Einbeziehung von 5'- und 3'-umgebenden Sequenzen des Moleküls schienen die Struktur nicht zu beeinflussen (Fig.30, 31).

Diese perfekte hair-pin-Struktur wurde auch in Zusammenhang von Untersuchungen der evolutionären Selektion und der Verteilung solcher Strukturen in viralen DNAs von Müller und Fitch (1982) gefunden und solchen Strukturen eine mögliche Regulationsfunktion in der Replikation, Transkription und mRNA-Prozessierung zugesprochen.

Es stellt sich damit die Frage, ob phagenspezifische Transkripte durch die gleiche Aktivität beeinflusst werden, die auch für zelluläre Prozessierungsreaktionen verantwortlich ist, und ob Sequenzspezifitäten für die Prozessierungsstellen aufgezeigt werden können.

3'-endonukleolytische Spaltung, die die Degradation von mRNA kontrolliert, wurde beim Phagen Lambda nach Prozessierung der 3'-terminalen hair-pin-Struktur der *int* mRNA durch RNase III

nachgewiesen (Schmeissner et al., 1984).

Für RNase E, die in *E. coli* an der Reifung der 9S RNA zur 5S rRNA beteiligt ist, wurde gezeigt, daß sie eine essentielle Rolle in der Prozessierung der Gen 32-mRNA von T4 spielt (Mudd et al., 1988). Eine Reihe von Sequenzen in Vorstufen der rRNA und tRNA sind Angriffstellen für endonukleolytischen Abbau, wobei das 3'-Ende von *E. coli*- und T4-tRNA-kodierenden Sequenzen gleichzeitig Gemeinsamkeiten zu flankierenden Sequenzen von mRNA-Spaltstellen des Phagen f1 aufweisen (Blumer et al., 1984). Die Prozessierung der f1 mRNA führt zu einer unterschiedlichen Expression von Genen, die auf einem Transkript liegen und erlaubt dadurch differentielle Regulation zweier Gene auf einem Operon.

Durch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Homologievergleiche von Sequenzen, die nach Prozessierung der *lac*-mRNA für mRNA-Fragmente am Ende des *lacZ* Gens (*lac55* :5'-U-G-U-C-A-A-A-A-U- 3') identifiziert wurden, mit der PhiX174-Sequenz und der von Lambda PL-GenD/E-mRNA (Anhang 4 A,B) wurden Homologie dieser *lac55*-Sequenz und der PhiX174-Sequenz (Sanger et al., 1978) bei Nukleotid 817-825 (Gen D und E) und dementsprechend auf der PL-GenD/E-mRNA bei Nukleotid 586-595 (Anhang .4) gefunden. Besonders zu erwähnen ist noch, daß 9 von 10 Basenpaarübereinstimmungen mit einer weiteren PhiX174-Sequenz am Ende von Gen K bei Nukleotid 209-217 (Sanger et al., 1978) gefunden wurde. Gen K gehört neben den Genen E und B ebenfalls zu den überlappenden Genen des PhiX174-Genoms.

Eine weitere Reihe von sehr signifikanten Homologien wurden durch Vergleich der Sequenz eines anderen *lac* mRNA-Fragments innerhalb des *lacY*-Gens (*lac240*:5'-G-G-U-A-U-U-A-U-U-U-U-G-C-C-G- 3') mit der PhiX174 Gen E-Sequenz und der PL-GenD/E-mRNA (bei Position 409-417, 478-490, 508-513) erhalten (Anhang 5). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Reihe solcher Sequenzen als Erkennungsstellen für Endonukleasen fungieren, da für die PL-GenD/E-mRNA mehrere mRNA-Fragmenten gefunden wurden (Fig.26).

Am 3'-terminalen Ende der PL-GenD/E-mRNA (an Position 557-600) befindet sich somit neben einer ausgeprägten Sekundärstruktur auch eine spezifische Sequenz, die eine mögliche Erkennungsstelle für zelluläre Nukleasen sein kann (Fig. 53).

Neben der Sequenzspezifität als Zielerkennung können RNasen ebenso durch die Strukturspezifität der mRNA beeinflusst werden und umgekehrt. Für Spaltung der *lac*-mRNA wurde nach der *lac55*-Spaltstelle eine ausgeprägte stem-loop-Struktur vorhergesagt (Cannistraro et al., 1986). Einige Endonukleasen haben Spezifität für Pyr-A Bindungen einzelsträngiger mRNA, wobei die RNase A die am besten untersuchte ist (King et al., 1986). Auch die Nukleotide, die auf der PL-GenD/E-mRNA Homologien zu der *lac55*-Sequenz aufzeigen, befinden sich zum Teil in ungepaarten Bereichen und weisen eine PyrA-Bindung auf. Die Spaltung der PL-GenD/E-mRNA als Resultat eines Endonukleaseangriffs in ein Fragment von ungefähr 600b (Fig 26) könnte damit bei Nukleotid 595 des Transkripts erfolgen (Fig.53).

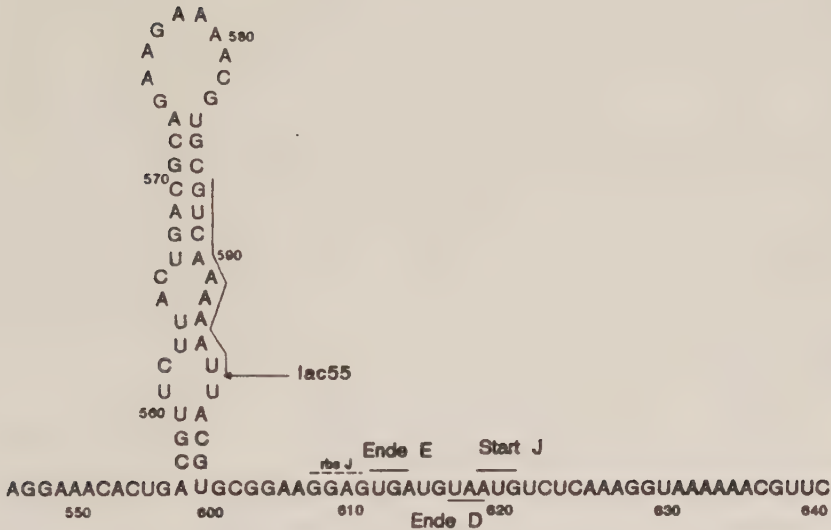


Fig. 53 Mögliche Sekundärstruktur des $P_{L-GenD/E}$ -Transkripts bei Nukleotid 550-640 und homologe RNase-Erkennungsstelle (lac_{55})

Untersuchungen über die Verteilung von statistisch signifikanten hair-pin-Strukturen auf dem PhiX174-Genom ergaben, daß sie mit wesentlich höher Frequenz in strukturellen als in nicht-strukturellen Domänen des PhiX174-Genoms auftreten und daß sie in intercistronischen Regionen überrepräsentiert sind (Müller und Fitch 1982). Führt man solche Betrachtungen auch für die Verteilung von möglichen Endonuklease-Erkennungsstellen (z. B. lac_{55} und lac_{240}) durch, so kann ebenfalls eine Anhäufung solcher Sequenzen in strukturellen Bereichen des PhiX174-Genoms aufgezeigt werden (Fig. 54). Die biologische und regulatorische Signifikanz von Struktur-Sequenz-Beziehungen kann somit für die Genexpression von PhiX174 nicht ausgeschlossen werden.

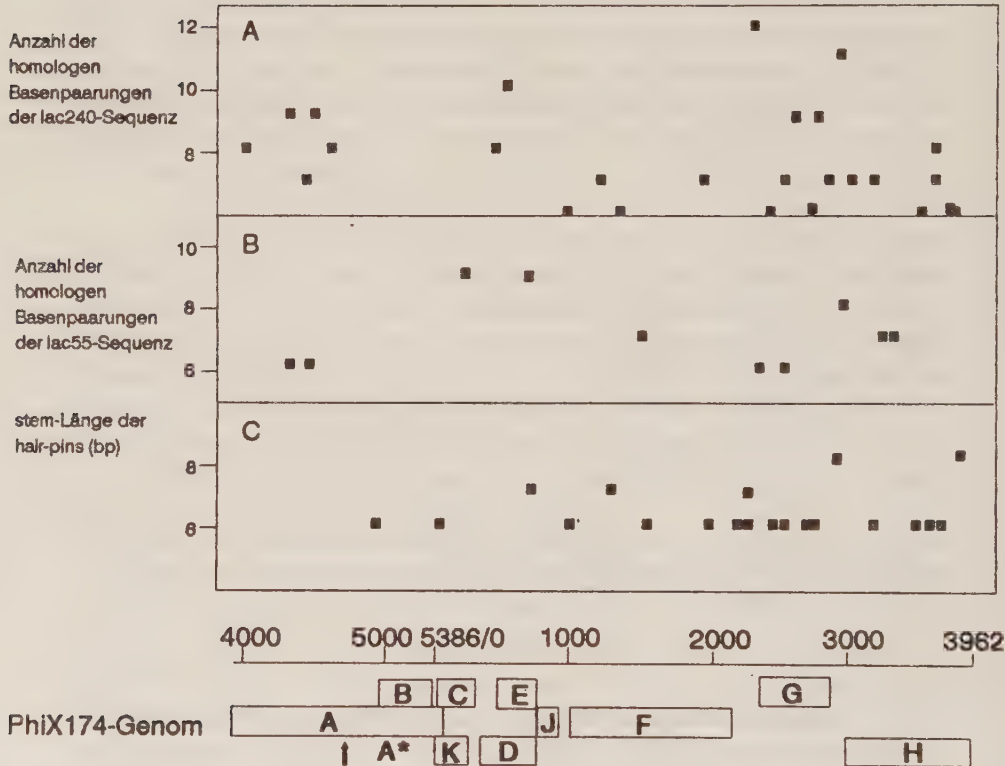


Fig.54 Verteilung von signifikanten hair-pin-Strukturen und spezifische Endonuklease-Erkennungssequenzen auf dem PhiX174-Genom

Das PhiX174-Genom ist mit Anordnung der Gene auf der X-Achse dargestellt.

A. Verteilung homologer Basenpaarungen der lac240-Sequenz auf dem PhiX174-Genom.

B. Verteilung homologer Basenpaarungen der lac55-Sequenz auf dem PhiX174-Genom.

Auf der Y-Achse ist die Anzahl der homologen Basenpaarungen wiedergegeben. Die Daten wurden nach Homologievergleich (Computerprogramm Microgenie, Beckman) ermittelt und die Anzahl der homologen Nukleotide gegen die Nukleotid-Koordinaten der PhiX174-Sequenz aufgetragen.

C. Die Position von perfekten hair-pins mit Basenpaarungen größer als 6 im stem-Bereich (Y-Achse) wurde gegen die Nukleotid-Koordinaten des PhiX174-Genoms aufgetragen (nach Müller und Füch 1982).

3. Erhöhte Prozessierung in *pxIA* Mutanten

In *E. coli* *pxIA* GH56(pSB12) und GH56(pSB35), die konstitutiv Gen D und Gen E exprimieren, konnten die Gen D- und Gen E-spezifischen Transkriptions- und Translationsprodukte nicht nachgewiesen werden (Fig. 16). In *pxIA* Mutanten, in denen die Expression der Gene vom Lambda PL durch die *cl₈₅₇*-Repressorfunktion kontrolliert werden konnte, wurde nach Induktion sowohl eine Reduktion des Gehalts an Intaktem Protein als auch das Auftreten von Proteinfragmenten beobachtet. Daraus wurde geschlossen, daß durch die *pxIA* Mutation bei ständiger Anwesenheit von Gen D- und Gen E-spezifischen Produkten erhöhter Abbau dieser Produkte erfolgt.

In *pxIA* Mutanten und unter Einfluß der klonierten *pxIA*-Sequenz konnten die gleichen PL-GenD/E-mRNA-Klassen identifiziert werden, die auch in Wildtypzellen gefunden werden, jedoch traten kürzere mRNA-Spezies zu früheren Zeitpunkten als in *pxl*⁺-Zellen auf (Fig. 21, 42).

- In *pxIA* Mutanten wurde der Maximalwert an nachweisbarem Intaktem Transkript schon wesentlich früher erreicht als in *pxl*⁺-Zellen (Fig. 21, 23A, 24A).

- Der prozentuale Anteil an Intaktem Transkript war in *pxIA* Mutanten wesentlich geringer als in *pxl*⁺-Wildtypzellen (Fig. 23B, 24B).

- Nach Induktion der Transkription erfolgte in *pxIA* Mutanten eine rasche Nivellierung von Intaktem Transkript zu einem 3'-terminal verkürzten 600b mRNA-Fragment mit relativ langer Halbwertszeit, das zu späteren Zeitpunkten nach Induktion auch in Wildtypzellen nachgewiesen wurde (Fig. 20, 21).

- Nach Inhibierung der Transkription von PL-GenD/E-mRNA mit Rifampicin 10 min nach Induktion erfolgte in *pxl*⁺ eine Verschiebung des Gehalts von intakten zu verkürzten Transkripten. In Zellen, in denen *pxIA* vom Plasmid ausgedrückt wurde, sank der Gesamtgehalt an nachweisbaren mRNAs wesentlich schneller als in *pxl*⁺ Wildtypzellen (Fig. 42).

- Durch Quantifizierung der PL-GenD/E-mRNA in *pxl*⁺ und *pxIA*-Zellen konnte gezeigt werden, daß unter Einfluß von *pxIA* das molare Verhältnis von intaktem PL-GenD/E-Transkript zu Transkriptfragmenten verändert ist. Weiterhin wurde festgestellt, daß nicht die mRNA-Fragmentgrößen, sondern der Gehalt der einzelnen mRNA-Klassen in *pxIA* Mutanten zugunsten von Abbauprodukten stärker als in *pxl*⁺-Zellen verschoben war (Tab. 9 und 10, Fig. 23 und 24).

3. Stabilsierungsstruktur im 3'-terminalen Bereich des 600b PL-GenD/E-mRNA-Fragments

In *pxIA* Mutanten (Fig. 21) oder unter Einfluß der klonierten *pxIA*-Sequenz (Fig. 42) wurde ein erhöhter Abbau des intakten Transkripts zugunsten einer 3'-terminal von 761b auf 600b verkürzten mRNA aufgezeigt. Durch die 3'-Deletion der stabilsierenden hair-pin-Struktur an T_J erfolgte ein wesentlich schnellerer Abbau des gesamten Transkripts. Diese Beobachtung unterstützt die von Hayashi und Hayashi (1985) gemachte Hypothese der "Barrierefunktion" der hair-pin-Struktur für endonukleolytischen Angriff.

Das 600b mRNA-Abbauprodukt trat im Northernblot von *pxIA*-Zellen neben dem intakten Transkript (761b) als prominente und diskrete Bande auf, was voraussetzen würde, daß ein 3'-5'-exonukleolytischer Angriff, der zu einem raschen Abbau der mRNA führt, verzögert ist oder eine gewisse Stabilisierung dieser mRNA-Fragmente erfolgt. Untersuchungen von Hayashi et al. (1988) über die gemeinsame Struktur von Stabilisierungssignalen von Φ X174-mRNAs haben gezeigt, daß sowohl potentielle hair-pin-Strukturen als auch die umgebenden Sequenzen notwendige Voraussetzung für eine mRNA-Stabilisierung sind. Upstream des 3'-Endes von Φ X174-mRNAs, die an T_J, T_F, T_G und T_H enden, befinden sich neben ausgeprägten hair-pin-Strukturen Sequenzen, die komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA sind und, außer für die mRNA, die an T_H endet, nicht die Ribosomenbindungsstellen der nachfolgenden Gene darstellen. Weiter wurde vermutet, daß eine Anhäufung von Us (Pyrimidine) oder As (Purine) upstream und downstream von hair-pin-Strukturen zur Stabilisierung von mRNA-Molekülen beitragen. Nachfolgend an die aufgezeigte hair-pin-Struktur (Fig.53) der Φ X174-mRNA XIII und der P_L-GenD/E-mRNA (bei Position 557-600) befindet sich 3'-seitig die Shine-Dalgarno-Sequenz (Shine und Dalgarno 1974) von Gen J, die noch innerhalb der letzten Gen D- und Gen E-spezifischen Condons liegt. Gleichzeitig findet man in diesem Bereich eine Anhäufung von A-Nukleotiden. Diese Zusammenhänge würden für ein Stabilisierungssignal an dieser Position der mRNA sprechen.

Genaue Grundlagen des Einflusses solcher Sequenz-Struktur-Beziehungen auf die Expression der umliegenden Gene sich jedoch noch unklar.

Die aufgezeigten Studien an spezifischen P_L-GenD/E-mRNAs nach Induktion der Genexpression in *pxI*⁺-Zellen und *pxIA* Mutanten zeigten, daß auch im normalen zellulären Hintergrund die Bildung von 3'- und 5'-deletierten P_L-GenD/E-mRNA-Fragmenten möglich ist und unter Einfluß einer zellulären Mutation diese Prozessierungsreaktion wesentlich verstärkt ist. Neben dem intakten Transkript wird in *pxIA* Mutanten ein verhältnismäßig hoher Anteil eines 3'-terminal verkürzten 600b mRNA-Fragments gefunden. Dieses Fragment besitzt im 3'-Bereich die oben aufgezeigte Struktur (Fig.53). Die sich ergebende Kombination von ausgeprägter Sekundärstruktur, Gemeinsamkeit zu flankierenden Sequenzen der mRNA-Spaltstelle des *lacZ* Gens und zu stabilisierenden Strukturen anderer Φ X174-mRNAs scheint nicht zufällig zu sein.

Dieses 600b mRNA-Fragment kann aufgrund seiner 3'-terminalen Struktur und der umgebenden Sequenzen (Fig.53) eine Angriffsstelle einer zellulären Nuklease und damit das Produkt einer ersten endonukleolytischen Spaltung sein. Gleichzeitig kann diese mRNA durch die ausgeprägte Sekundärstruktur am 3'-Ende derart stabilisiert und vor exonukleolytischem Angriff geschützt sein, daß sie länger als andere mRNA-Fragmente in *pxIA* Mutanten nachweisbar war.

Der Initiationsschritt der Prozessierungsreaktion kann aufgrund der aufgetretenen diskreten mRNA-Fragmente (Fig.28 und 42) nicht auf eine unspezifische 3'-5'-Exonukleaseaktivität zurückgeführt werden. Vielmehr muß eine endonukleolytische Spaltung der intakten mRNA an einer (oder mehreren

Stellen) des Transkripts erfolgen, wodurch freie 3'-Enden der mRNA für 3'-5'-Exonukleasen zugänglich werden.

Die biologische Relevanz dieser endonukleolytischen Spaltung ist möglicherweise nicht nur für den "turn-over" dieser mRNA und damit für die Regulation der Genexpression, sondern auch für die Expression von Protein J von entscheidender Bedeutung. Ebenso wie die Translationsinitiation von Gen E ist der Mechanismus der unterschiedlichen Translationseffizienz der auf dieser mRNA kodierten Gene D und J bisher noch unklar. Die Ribosomenbindungsstelle von Gen J liegt innerhalb der letzten Gen E- und Gen D-spezifischen Codons und wird normalerweise durch die translatierenden Ribosomen der vorhergehenden Gene überdeckt (Fig.53). Vermutungen über mögliche lokale Wechselwirkungen für die Gen J Expression durch die mRNA-Tertiärstruktur konnten bisher jedoch noch nicht bestätigt werden (Hayashi et al., 1988). Eine interne Prozessierung der mRNA könnte daher eine mögliche Regulationsfunktion bedeuten. Analysen der nach Induktion der Gen D-, E- und J-Expression vom Plasmid pSB35 translatierten Proteine hatten gezeigt, daß in *pxlA* Mutanten die Protein D- und E-Konzentration reduziert ist, die Bildung von Protein J jedoch nicht beeinträchtigt wird (Fig.16).

Weitere Hinweise auf eine Prozessierung von Gen E-spezifischer mRNA wurde durch Behandlung *in vitro* transkribierter mRNA mit 100000g Zellextrakten von *pxl*⁺ JF448 und *pxlA* GH56 erhalten, wobei gezeigt wurde, daß die Aktivität einer zellulären Nuklease in *pxlA* Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht war (Hintermeier 1988).

Eindeutiger Nachweis, daß die Spaltung am 3'-terminalen Ende des intakten Transkripts an der beschriebenen hair-pin-Struktur der P_{L-GenD/E}-mRNA (Position 580-600) erfolgt, kann erst nach Sequenzierung der 3'-Endes des 600b mRNA-Fragments erbracht werden. Daß die aufgezeigte hair-pin-Struktur eine spezifische Angriffstelle für zelluläre Nukleasen darstellt, kann durch Einbau dieser Sequenz in bekannte Gene und die Analyse der resultierenden mRNA-Spezies erfolgen. Für diese Untersuchungen bieten sich besonders das *lacZ* Gen, das *ompA* Gen und das *trp* Gen an, da die Prozessierungsprodukte dieser mRNAs sehr gut untersucht sind (Kano und Imamoto 1979, Cannistraro et al., 1986, Subbarao und Kennell 1988, Melefors und van Gabain 1988).

Erhöhte Prozessierung von P_{L-GenD/E}-spezifischer mRNA in stationärer Wachstumsphase von *E. coli*

Zellen in stationärer Wachstumsphase können durch Protein E nicht lysiert werden. Bisher nahm man an, daß in dieser Wachstumsphase das autolytische System, das eine notwendige zelluläre Voraussetzung der Lyse darstellt (Lubitz et al., 1984a), ausgeschaltet oder vermindert ist. Die in dieser

Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten, daß trotz ständiger Expression von Gen E vom Plasmid pSB12 oder Gen D und E vom Plasmid pSB35 weder eine Anhäufung von spezifischer mRNA noch von Protein D oder E gefunden werden können. Es wurden die gleichen intrazellulären Konzentrationen der Proteine D und E wie in exponentiell gewachsenen Kulturen nachgewiesen (Kapitel F., Fig.45). Weiter wurde festgestellt, daß eine erhöhte Prozessierung von $P_{L-GenD/E}$ -mRNA, die unter Einfluß von $pxiA$ erfolgt, auch in Zellen in stationärer Wachstumsphase stattfindet (Fig.46-48). Da Protein E in Zellen in stationärer Phase über mehrere Stunden stabil ist und funktionell aktiv bleibt (Bläsi 1987), ist die Ursache der unterschiedlichen Genexpression entweder auf eine Inhibierung der weiteren Translation oder auf posttranskriptionaler Ebene zu suchen. Eine Regulation scheint nach Befunden von Bläsi (1987) in stationärer Phase auf einem Block im Mechanismus der Protein E-Lyse zu bestehen. Die in dieser Arbeit geschilderten Ergebnisse zeigen zudem eine erhöhte Prozessierung der Gen E-spezifischen mRNA, wodurch die intrazelluläre Konzentration an Protein E nicht über ein "kritisches" Maß steigt.

Eine über das "normale" Maß erhöhte, intrazelluläre Konzentration von Protein E anzureichern, war trotz vieler Anstrengungen bisher nicht möglich, und es ist daher fraglich, ob aufgrund der existierenden Wirtsfunktionen, die direkt auf die Gen E-spezifische mRNA wirken, eine solche Anreicherung überhaupt zu erreichen ist.

Die Zuordnung der Größenklassen der gefundenen mRNA-Spezies scheint den Schluß zuzulassen, daß unter den untersuchten Bedingungen ($pxiA^+$, $pxiA$, exponentieller und stationärer Wachstumsphase) qualitativ die gleichen mRNA-Fragmente entstehen, jedoch abhängig von zellulären Faktoren ($pxiA$, stationärer Phase) eine quantitative Verschiebung zugunsten prozessierter mRNAs erfolgt. Es existieren damit zelluläre Mechanismen, die gewisse mRNA-Sequenzen spalten, ohne andere zellulären Prozesse zu beeinflussen. Ob regulatorische Wirtsfunktionen in stationären E. coli Zellen zu einer erhöhten Nukleaseaktivität führen, kann nicht gesagt werden. Das neu kartierte mRNA-Prozessierungs-Gen könnte ein möglicher Kandidat für eine solche Zellstadium-abhängige Nuklease sein. Dabei würde sich Gen E-spezifische mRNA für die Untersuchungen der Regulation dieser Aktivität als Modellstudie anbieten.

Für den Einfluß der veränderten zellulären Nukleaseaktivität auf die $P_{L-GenD/E}$ -mRNA kann daher folgendes Modell (Fig. 55) vorgeschlagen werden. Die Transkription von mRNA erfolgt in Wildtyp- und $pxiA$ -Zellen mit normaler Rate. Abhängig von zellulären Faktoren ($pxiA$, stationäre Wachstumsphase), wird die Stabilität dieses Transkripts durch verstärkten Angriff einer zellulären Nuklease derart beeinflusst, daß eine rasche Degradation der mRNA erfolgt. Da für die Lyse der Zellen eine "kritische" Mindestmenge an Protein E notwendig ist und $pxiA$ Mutanten trotz konstitutiver Expression von Gen E vom Plasmid überleben, wird diese "kritische" Protein E Konzentration nie erreicht.

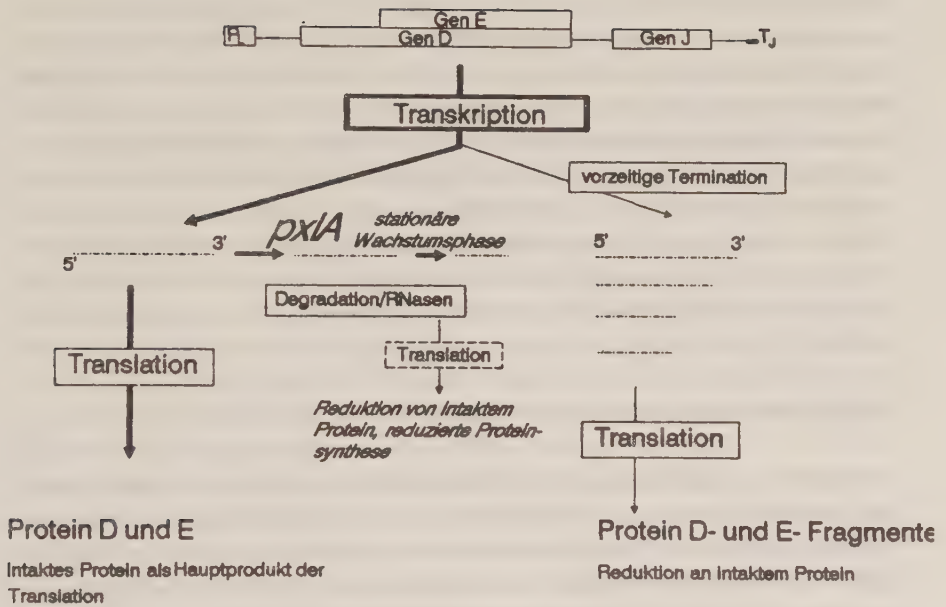


Fig.55 Modell der spezifischen Beeinflussung der $P_{L-GenD/E}$ -mRNA durch zelluläre Faktoren.

Die Hypothese, daß das Genprodukt von **pxiA** für eine veränderte Nukleaseaktivität verantwortlich ist, kann möglicherweise durch folgende Zusammenhänge unterstützt werden: Die Gene, die für die 13,5kD Proteinkomponente der RNaseP **rnpA**, eine Endonuklease (Apirion 1980) und für eine veränderte Ribonuklease II-Aktivität **sts^A**, eine Exoribonuklease, (Lennette und Apirion 1971) kodieren, sind in genomischer Umgebung zu **pxiA** lokalisiert. Möglicherweise können noch weitere Gene für Nukleasen in diesem Bereich gefunden werden. Besonders auffällig ist, daß die Gene von Nukleasen, die an Prozessierungsreaktionen beteiligt sind, in Gegenden des Chromosoms gefunden wurden, in denen die Gene ihrer Substrate (meist tRNAs und rRNAs) geklustert vorkommen.

Einer der entscheidenden Aspekte der mRNA-Degradation ist, daß die Rate des Abbaus fast gleich ist mit der funktionellen Inaktivierung. Da bisher keine 5'-Exonukleasen bekannt sind (Apirion 1984, King et al., 1986), scheint der Abbau über eine Kooperation der Ribonukleasen (Endo- und Exo) zu erfolgen, um alle Strukturen und Sequenzen eliminieren zu können. Endonukleasen scheinen die "Barrieren" (meist doppelsträngige RNA) auf der mRNA für 3'-Exonukleasen zu entfernen. Die sequentielle Abtrennung von mRNA-Fragmenten durch endonukleolytische Aktivität mit relativ breiter Spezifität ist durch die Anhäufung der Zahl der "Substratenden" für Exonukleasen wohl der kritische Punkt für den raschen Abbau der mRNA-Fragmente. Falls die mRNA-Degradation ausschließlich 3'-exonukleolytisch wäre, so würde die Nukleaseaktivität solange blockiert werden, bis das letzte Ribosom von der mRNA freigesetzt ist. Daher scheint die endonukleolytische Spaltung sehr wichtig für die Rate des Abbaus und gleichzeitig essentiell für den Totalabbau der mRNA zu sein (Cannistraro et al., 1986).

Einfluß der **pxiA Mutation auf die Lyse von *E. coli* nach PhiX174-Infektion**

Nach Infektion von **pxiA** Mutanten mit PhiX174-Phagen erfolgte Lyse der Zellen. Die **pxiA** Mutation hatte somit keinen Einfluß auf die Phagenreplikation und die phageninduzierte Lyse. Die in **pxiA** Mutanten gemachte Beobachtung der erhöhten Prozessierung von PL-GenD/E-spezifischer mRNA wird durch die Synthese der verschiedenen PhiX174 mRNA-Klassen möglicherweise derart ausbalanciert, daß die Bildung von ausreichender Protein E-Menge von PhiX174- oder plasmidkodierten mRNAs erfolgt. Daß eine plasmidkodierte Gen E Expression in **pxiA** Mutanten erfolgen kann und die Gen Eam3-Mutation (Lyse-negativ) komplementiert wird, ist der experimentelle Beweis, daß der intrazelluläre Gehalt an Gen E-spezifischer mRNA durch die zusätzlichen PhiX174-mRNAs die Nukleaseaktivität ausbalanciert und genügend translatierbares Transkript für die Synthese von ausreichenden Protein E-Mengen zur Verfügung steht.

PhiX174- und Protein E-induzierte Lyse zeigen quantitative Unterschiede. Eine funktionelle Beeinflussung der Protein E-induzierten Lyse durch Protein K wurde für PhiX174-infizierte Zellen festgestellt (Gillam et al., 1985). Nach Expression des klonierten Gens K zeigten PhiX174-infizierte Zellen eine reduzierte Lyserate, wogegen gleichzeitige Expression der Gene K und E vom Plasmid die Lyserate der Zellen nicht beeinträchtigte (Bläsl et al., 1988). Protein H, das als "pilot protein" der

Phagen-Adsorption und zur DNA-Aufnahme dient, wurde eine multiple Funktion in der Phagenentwicklung zugesprochen (Jazwinski et al., 1975). Mutationen im Gen H können die Phagen-Induzierte Lyse von *E. coli* beeinträchtigen (Hutchison und Sinsheimer 1966, Sinsheimer 1968). Es ist damit nicht auszuschließen, daß durch andere Phagenproteine eine zusätzliche Beeinflussung der Lyse von *E. coli* nach Infektion mit PhIX174 erfolgt.

Heterologe Expression von Gen E in grampositiven Bakterien

Die Expression von Gen E vom *E. coli*/B. subtilis-Shuttle Plasmid pGH1 zeigte keinen eindeutigen Effekt auf das Wachstum von transformierten *E. coli* Zellen. Dies könnte möglicherweise auf der Tatsache beruhen, daß durch die veränderte Ribosomenbindungsstelle von Gen E und den ungünstigen Abstand der Shine-Dalgarno-Sequenz zum Initiationsstart AUG (21bp) eine Expression von Gen E in *E. coli* nicht möglich ist. Band und Henner (1984) hatten gezeigt, daß die Expression von Leukozyten Interferon A unter der Ribosomenbindungsstelle pSIFIII, die ebenfalls in Plasmid pSI-I kloniert wurden (Yansura und Henner 1984), optimale Expression von Interferon A in *B. subtilis* ergab. In *E. coli* wurde mit diesem Konstrukt jedoch nur 1/20 der Proteinmenge gebildet.

Ein starker Einfluß auf das Wachstum von transformierten *Staphylococcus carnosus* SA311(pGH1)-Klonen konnte nach Gen E-Expression beobachtet werden. Der letale Effekt nach Induktion der Gen E Expression setzt sowohl Transkription als auch die Translation voraus, was neben den Sequenzdaten die aufwendige Konstruktion (Fig.49 und 50) Gen E-spezifischer Sequenzen in Plasmid pGH1 funktionell bestätigte. Die Expression von Gen E führte in *S. carnosus* SA311(pGH1) im Gegensatz zur Expression von Gen E in *E. coli* von Vektoren für gramnegative Bakterien (pUH12, pSB12) nicht zur Lyse der Zellen, sondern hatte lediglich einen letalen Effekt (Fig.52).

Das Modell des Wirkungsmechanismus der Protein E-induzierten Lyse von *E. coli* schlägt die Integration von Protein E-Molekülen in die innere und äußere Membran gramnegativer Bakterien und die Ausbildung einer tunnelartigen Struktur vor. Durch die Protein E-spezifische Tunnelstruktur kommt es zum Ausfließen cytoplasmatischer Bestandteile, während periplasmatische Enzyme weitgehend zurückgehalten werden (Witte und Lubitz 1988). Für Protein E scheint eine Integration in die Membran von grampositiven Bakterien möglich zu sein (letaler Effekt). Aufgrund der fehlenden äußeren Membran kann jedoch die notwendige Struktur des Protein E-Lysekomplexes nicht ausgebildet werden. Ferner könnte die notwendige Oligomerisierung von Protein E (Bläsi et al., 1989) in grampositiven Bakterien funktionell gestört sein.

Für die Protein E-induzierte Lyse von *E. coli* wird ein aktives autolytisches Systems vorausgesetzt; grampositive Bakterien sind wesentlich labiler gegen die Einwirkung von Induktoren des autolytischen System als gramnegative Bakterien. Eine mögliche Wechselwirkung von Protein E mit regulatorischen Funktionen des autolytischen Systems grampositiver Bakterien muß daher eher ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

Für die Lyse von *E. coli* nach Infektion mit dem Bakteriophagen PhiX174 ist das phagenkodierte Protein E verantwortlich. Neben einer strengen Expressionskontrolle von Gen E zur Verhinderung der frühzeitige Lyse nach Phageninfektion werden auch spezifische zelluläre Voraussetzungen für die Wirkung von Protein E benötigt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen über den Einfluß zellulärer Mutationen auf die PhiX174 Gen E-Expression und die Protein E-induzierte Lyse von *E. coli* ergaben folgende Ergebnisse:

- Durch Untersuchung des Einflusses der zellulären Mutation **lytB**, die in *E. coli* zur Toleranz gegen Penicillin-induzierte Autolyse führt, auf die Protein E-induzierte Lyse wurde festgestellt, daß die Protein E- und Penicillin-induzierte Lyse von *E. coli* keine gemeinsamen Wege der Autolysekaskade benutzen, sondern gemeinsamen übergeordneten regulatorischen Funktionen der Zelle unterliegen.
- Ein Einfluß der regulatorischen Funktion **wec** zur Koordination von Zellelongation und Zellteilung auf die Protein E-induzierte Lyse konnte nicht gefunden werden.
- Durch eine neu isolierte Protein E lyseresistente *E. coli* Mutante (**pxIA**) konnten erstmals zelluläre Einflüsse auf die Gen E Expression untersucht werden.
- F'-Komplementationsanalysen ergaben, daß **pxIA** dominant über die Wildtyp-Funktion ist. Nach genetischer Kartierung konnte die **pxIA** Mutation bei Minute 83,3 auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert werden.
- Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der phänotypischen Resistenz von **pxIA** Mutanten zeigten, daß unter Einfluß von **pxIA** eine Reduktion der Synthese von Protein D (-1 Frame zu Gen E) erfolgt und C-terminal verkürztes Protein D gebildet wird. Durch Analyse der Gen E-spezifischen mRNA wurde nachgewiesen, daß durch die erhöhte Aktivität einer zellulären Nuklease die Gen E-spezifische mRNA in **pxIA** Mutanten vermehrt gespalten wird. Es wurde weiter festgestellt, daß der Initiationsschritt des Abbaus der mRNA sowohl in Wildtyp- als auch in Mutantenzellen an einer spezifischen Stelle des Transkripts im 3'-Bereich von Gen D und E erfolgt, die Rate des Abbaus in **pxIA** Mutanten jedoch wesentlich erhöht ist.
- Durch computergestützte Analysen der Gen E-spezifischen mRNA im Bereich der Spaltstelle konnten eine ausgeprägte hairpin Struktur sowie Sequenzhomologie zu mRNA-Spaltstellen zellulärer Gene gefunden werden.
- Es konnte damit festgestellt werden, daß die Regulation der Gen E-Expression nicht nur auf translationeller, sondern auch auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet.
- Durch Klonierung der **pxIA**- und der **pxI**⁺-Wildtyp-Sequenz konnte gezeigt werden, daß größere Veränderungen auf DNA-Ebene zur **pxIA** Mutation geführt hatten.

- Die Expression von Gen E im zellulären Hintergrund der klonierten **pxIA**-Sequenz führte zum gleichen Phänotyp der schon in **pxIA** Mutanten beobachtet wurde.
- Untersuchungen zur Gen E-Expression in Zellen in exponentieller und stationärer Wachstumsphase von *E. coli* wiesen darauf hin, daß in stationärer Wachstumsphase ebenfalls eine erhöhte Prozessierung der Gen E-spezifischen mRNA erfolgt.
- Expression von Gen E im heterologen System grampositiver Bakterien hatte einen letalen Effekt auf die Zellen. Das Modell, daß Protein E durch Integration in das Zwei-Membranen-System (äußere und innere Membran) von *E. coli* und Ausbildung eines Komplexes die Lyse auslöst, konnte damit unterstützt werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Adams, M.H.** (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers, New York, London, Sidney.
- Altman, E., Young, K., Garrett, J., Altman, R., Young, R.** (1985). Subcellular localization of lethal proteins of bacteriophage Lambda and PhiX174. *J. Virol.* **53**:1008-1011.
- Apirion, D.** (1980). Genetic mapping and some characterization of the *rnvA49* mutation in *Escherichia coli* which affects the processing of ribonucleic acid. *Genetics* **94**:291.
- Apirion, D.** (1984). Processing of RNA. (Ed: D.Apirion) CRC Press, Inc. Boca Roton, Florida.
- Axelrod, N.** (1976). Transcription of Bacteriophage PhiX174 In vitro: Analysis with restriction enzymes *J. Mol. Biol.* **108**:771-779.
- Bachmann, B.J.** (1983). Linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol. Rev.* **47**:180-230.
- Band, L., Henner D.J.** (1984). *Bacillus subtilis* requires a "stringent" Shine-Dalgarno region for gene expression. *DNA* **3**:17-21.
- Barrell, B.G., Air, G.M., Hutchison III, C.A.** (1976). Overlapping genes in bacteriophage PhiX174. *Nature* **264**:34-41.
- Bayer, M., Starkey, T.** (1972). The adsorption of bacteriophage PhiX174 and its interaction with *E. coli*. A kinetic and morphological study. *Virology* **49**:236-256.
- Bayer, M.E.** (1979). The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection. In: *Bacteria Outer Membrane* (Ed: Inouye, M.) Wiley, New York pp. 167-202.
- Begg, J., Donachie, W.D.** (1978). Changes in cell size and shape in thymine-requiring *Escherichia coli* associated and growth in low concentrations of thymine. *J. Bacteriol.* **133**:452-458.
- Belfort, M., Pederson-Lane, J., West, D., Ehrenman, K., Maley, G., Chu, F., Maley, F.** (1985). Processing of the intron-containing thymidylate synthetase (*td*) gene of phage T4 is at the RNA level. *Cell* **41**:375-383.
- Benbow, R.M., Hutchison III, C.A., Fabricant, J.D., Sinsheimer, R.L.** (1971). Genetic map of bacteriophage PhiX174. *J. Virol.* **7**:549-558.
- Benbow, R.M., Mayol, R.F., Picchi, J.C., Sinsheimer, R.L.** (1972). Direction of translation and size of bacteriophage PhiX174 cistrons. *J. Virol.* **10**:99-114.
- Berkhout, B., Kastelein, R.A., Duin van, J.** (1985). Translational interference at overlapping reading frames in procaryotic messenger RNA. *Gene* **37**:171-179.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513-1523.

- Bläsi, U., Geisen, R., Lubitz, W., Henrich, B., Plapp, R.** (1983). Localization of the bacteriophage PhiX174 lysis gene product in the cell envelope of *Escherichia coli*. In: Target of Penicillin (Ed: Hakenbeck, R., Höltje, J.V., Labischinski, H.) Walter de Gruyter, Berlin und New York pp.205-210.
- Bläsi, U., Henrich, B., Lubitz, W.** (1985a). Lysis of *Escherichia coli* by cloned PhiX174 gene E depends on its expression. *J. Gen. Microbiol.* **131**:1107-1114.
- Bläsi, U., Lubitz, W.** (1985b). Influence of C-terminal modifications of PhiX174 lysis gene E on its lysis-inducing properties. *J. Gen. Virol.* **66**:1209-1213.
- Bläsi, U.** (1987). Untersuchungen zur Kontrolle der PhiX174 Gen E Expression und zum molekularen Mechanismus der E-induzierten Lyse von *Escherichia coli*. Dissertation, München.
- Bläsi, U., Lubitz, W., Young, R.** (1988). Evaluation of the interaction of the PhiX174 gene products E and K in E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *J. Virol.* **62**:4362-4364.
- Bläsi, U., Linke, R.P., Lubitz, W.** (1989). Evidence for membrane-bound oligomerization of bacteriophage PhiX174 lysis-protein E. *J. Biol. Chem.* in press
- Blumer, K.J., Steege, D.A.** (1984). mRNA processing in *Escherichia coli*: an activity encoded by the host processes bacteriophage T1 mRNAs. *Nucl. Acids Res.* **12**:1847-1426.
- Blundell, M., Craig, E., Kennell, D.** (1972). Decay rates of different mRNA in *E.coli* and models of decay. *Nature* **238**:46-49.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Falkow, S.** (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
- Brendel, V.** (1985a). Mapping of transcription terminators of bacteriophage PhiX174 and G4 by sequence analysis. *J. Virol.* **53**:340-342.
- Brendel, V., Trifonov, E.N.** (1985b). Computer-aided mapping of DNA-Protein interaction sites. In: P.S.Glaeser (ed). The role of data in the scientific progress. pp.115-118, Elsevier, North Holland Publ.Co., Amsterdam.
- Buckley, J.K., Hayashi, H.** (1986). Lytic activity localized to membrane spanning region of PhiX174 E protein. *MGG* **204**:120-125.
- Burnette, W.M.** (1981). Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified Nitrocellulose and radiographic detection with antibody and iodinated Protein A. *Analyt. Biochem.* **112**:195-203.
- Cannistraro, V.J., Subharao, M.N., Kennell, D.** (1986). Specific endonucleolytic cleavage sites for decay of *Escherichia coli* mRNA. *J. Mol. Biol.* **192**:257-274.
- Casadaban, M.J., Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**:179-207.
- Chen, C.Y., Hutchison III, C.A., Edgell, M.H.** (1973). Isolation and genetic localization of three PhiX174 promoter regions. *Nature New Biol.* **243**:233-236.
- Chu, K.F., Maley, G.F., Maley, F., Belfort, M.** (1984). Intervening sequence in the thymidylate synthetase gene of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3049-3053.

- Clarke, L., Carbon J. (1975). Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the *E. coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:4361-4365.
- Clarke, L., Carbon J. (1976). A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**:91-99.
- Clements, J.B., Sinsheimer, R.L. (1975). XXXVII. Process of infection with bacteriophage PhiX174. RNA metabolism in PhiX174 infected cells. *J. Virol.* **15**:151-160.
- Clewell, D.B. (1972). Nature of ColE1 plasmid replication in *E. coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **110**:667-676.
- Court, D., Huang, T.H., Oppenheimer, A.B. (1983a). Deletion analysis of the retroregulatory site for the Lambda int gene. *J. Mol. Biol.* **166**:233-240.
- Court, D., Schmeissner, U., Rosenberg, M., Oppenheimer, A.B., Guarneros, G., Mantanez, C. (1983b). Processing of Lambda int RNA: mechanism for gene control. In: D. Schlessinger (ed), *Microbiology-1983*. American Society of Microbiology, Washington, D.C., pp. 78-81.
- Cullem, J., Vicente, M. (1978). Cell growth and length distributions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **134**:30-337.
- Danilevskaya, O.N. (1980). Curing of *Escherichia coli* plasmids by Coumermycin. *MGG* **178**:233-235.
- Davies, R.W. (1980). DNA sequence of the int-xis p1 region of the bacteriophage Lambda: overlap of the int and xis genes. *Nucl. Acids Res.* **12**:4757-4768.
- Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**:23-28.
- De la Campa, A.G., Martinez-Salas, E., Tormo, A., Vicente, M. (1984). Coordination between elongation and division in *Escherichia coli* mediated by wee gene product. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2671-2679.
- De la Campa, A.G., Martinez-Salas, E., Tormo, A., Vicente, M. (1984). Co-ordination between elongation and division in *Escherichia coli* mediated by the wee gene product. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2671-2679.
- De la Campa, A.G., Tormo, A., Martinez-Salas, E., Aldea, M., Vicente, M. (1985). Cell length in a wee dnaA mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **164**:487-489.
- Denhardt, D.T., Sinsheimer, R.L. (1965). The process of infection with bacteriophage PhiX174. III. Phage maturation and lysis after synchronized infection. *J. Mol. Biol.* **12**:641-646.
- Donachie, W.D. (1968). Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature, London* **219**:1077-1079.
- Donachie, W.D., Begg, K.J., Vicente, M. (1976). Cell length, cell growth and cell division. *Nature, London* **264**:328-333.
- Donavan, W.P., Kushner, S.R. (1986). Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:120-124.
- Dunn, J.J., Studier, F.W. (1973). T7 early RNAs and *Escherichia coli* ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs in vivo by ribonuclease III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3296-3300.

Edlind, T.D., Ihler, G.M. (1980). Long range base pairing in bacteriophage PhiX174 single-stranded DNA. *J. Mol. Biol.* **142**:131-144.

Eigner, J.A.H., Stouthamer, J., Van der Sluys, J., Cohen, J.A. (1963). A study of the 70S component of bacteriophage PhiX174. *J. Mol. Biol.* **6**:61-84.

Feige, U., Stirm, S. (1976). On the structure of the E. coli cell wall lipopolysaccharid core and its PhiX174 receptor region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**:566

Freyemeyer, D.K., Shank, P.R., Edgall, M.H., Hutchison III, C.A., Vanaman, T.C. (1977). Amino acid sequence of the small protein from bacteriophage PhiX174. *Biochem.* **16**:4550-4556.

Fujisawa, H., Hayashi, M. (1977). Functions of gene C and D products of Bacteriophage PhiX174. *J. Virol.* **21**:506.

Fujimura, F.K., Hayashi, M. (1978). Transcription of isometric single-stranded DNA-Phage. In: *The single-stranded DNA phages.* ed. D.T. Denhardt, D. Dressler, D.S. Ray. Cold Spring Harbor, pp 485-505.

Funk, F.D., Snover, D. (1976). Pleiotropic effects of mutants in gene A of bacteriophage PhiX174. *J. Virol.* **18**:141-150.

Gillam, S., Astell, C.R., Jahnke, P., Hutchison III, C.A., Smith, M. (1984). Construction and properties of a ribosome binding mutation in gene E of bacteriophage PhiX174. *J. Virol.* **52**:892-896.

Gillam, S., Atkinson, T., Markham, A., Smith (1985). Gene K of bacteriophage PhiX174 codes for a protein which affects the burst size of phage production. *J. Virol.* **53**:708-709.

Godson, G.N., Fiddes, J.C., Barrell, B.G., Sanger, F. (1978). Comparative DNA-Sequences analysis of the G4 and PhiX174 genom. In: *The single stranded DNA phages.* (Ed: Denhardt, D.T., Dressler, D., Ray, D.S., Cold Spring Harbor Laboratory, New York p.51-86.

Goldfarb, A., Daniel, V. (1980). An Escherichia coli endonuclease responsible for primary cleavage of in vitro transcripts of bacteriophage T4 tRNA cluster. *Nucl. Acids Res.* **8**:4501-4516.

Gruss, A., Ehrlich, D. (1988). Insertion of foreign DNA into plasmids from gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. *J. Bacteriol.* **170**:1183-1190.

Gschwender, R.H., Hofschneider, P.H. (1969). Lysis inhibition of PhiX174-, MS2- and QB-infected Escherichia coli bacteria by magnesium ions. *Biochem. Biophysic. Acta* **190**:454-459.

Halfmann, G. (1983). Untersuchungen zum Mechanismus der Lyse von Escherichia coli durch den Bakteriophagen PhiX174. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.

Halfmann, G., Leduc, M., Lubitz, W. (1984). Different sensitivity of autolytic deficient Escherichia coli mutants to the mode of induction. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**:205-208.

Halfmann, G., Lubitz, W. (1986). Differential induction of Escherichia coli autolysis by Penicillin and the bacteriophage PhiX174 gene E product. *J. Bacteriol.* **166**:683-685.

Hamatake, R.K., Aoyama, A., Hayashi, M. (1985). The gene J of bacteriophage PhiX174: In vitro analysis of J protein function. *J. Virol.* **54**:345-350.

Harkness, R.E., Ishiguro, E.E. (1983). Temperature sensitive autolysis deficient mutants of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **155**:15-21.

- Harkness, R.E., Lubitz, W. (1987). Construction and properties of a chimeric bacteriophage lysis gene. *FEMS Microb. Lett.* **48**:19-24.
- Hayashi, M., Fujimura, F.K., Hayashi, M.N. (1976). Mapping of bacteriophage PhiX174 in vivo messenger RNA's. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:3519-3523.
- Hayashi, M.N., Hayashi, M., Imai, M. (1981a). Bacteriophage PhiX174 specific mRNA synthesis in cells deficient in termination factor rho activity. *J. Virol.* **38**:198-207.
- Hayashi, M.N., Hayashi, M. (1981b). Stability of bacteriophage PhiX174 mRNA in vivo. *J. Virol.* **37**:506-510.
- Hayashi, M.N., Hayashi, M. (1985). Cloned DNA sequences that determine mRNA stability of bacteriophage PhiX174 in vivo are functional. *Nucl. Acids Res.* **13**:5937-5948.
- Hayashi, M.N., Yaghmai, R., McConnell, M., Hayashi, M. (1988). mRNA stabilizing signals encoded in the genome of the bacteriophage PhiX174. in press
- Henrich, B., Lubitz, W., Plapp, R. (1982). Lysis of *Escherichia coli* by induction of cloned PhiX174 gene E. *MGG* **185**:493-497.
- Henrich, B. (1983a). Klonierung und Expression des Lysegens des Bakteriophagen PhiX174 in *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Henrich, B., Lubitz, W., Plapp, R. (1983b). Expression of PhiX174 lysis gene cloned into different plasmids. In: The target of Penicillin. (Ed: Hakenbeck, R., Höltje, J.V., Labischinski, H.) de Gruyter Berlin und New York p.197-203.
- Hintermeier, R. (1988). Reinigung und Charakterisierung einer DNase aus *Staphylokokken* sowie einer RNase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, LM-Universität München.
- Hohn B. (1979). In vitro packaging of Lambda and cosmid DNA. *Meth. Enzymol.* **68**: 299-309.
- Hsu, S., Fanger, H. (1981). Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem.* **29**:577-580.
- Hutchison III, C.A., Sinshelmer, R.L. (1966). The process of infection with bacteriophage PhiX174. Mutations in a PhiX174 lysis gene. *J. Mol. Biol.* **18**:429-447.
- Jazwinski, S.M., Lindberg, A.A., Kornberg, A. (1975). The gene H spike Protein of bacteriophage PhiX174 and S13. I. Functions in phage-receptor recognition and transfection. *Virology* **66**:283-293.
- Jones, N.C., Donachie, W.D. (1973). Chromosome replication, transcription and control of cell division in *Escherichia coli*. *Nature New Biology* **243**:100-103.
- Kano, Y., Imamoto, F. (1979). Evidence for endonucleolytic cleavage at the 5'proximal segment of the trp messenger RNA in *Escherichia coli*. *MGG* **172**:25-30.
- Karam, J., McCulley, C., Leach, M. (1977). Genetic control of mRNA decay in T4 phage-infected *Escherichia coli*. *J. Virol.* **76**:685-700.
- Kapitza, E.L., Stuchacheva, E.A., Shemyakin, M.F. (1976). Effect of *E. coli* rho-factor and RNase III on the formation of PhiX174 RNA in vitro. *FEBS Lett.* **98**:123-127.
- Kastelein, R.A., Berkhout, B., van Duin, J. (1983). Opening the closed ribosome-binding site of the lysis cistron of bacteriophage MS2. *Nature* **305**:741-743.

- King, T.C., Sirdeskmuks, R., Schlessinger, D. (1986). Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in procaryotes. *Microbiol. Rev.* **50**:428-451.
- Kleckner, N., Barker, D.F., Ross, D.G., Botstein, D. (1978). Properties of translocatable tetracycline-resistance element Tn10 in *Escherichia coli* and bacteriophage Lambda. *Genetics* **90**:427-461.
- Kleckner, N. (1981). Transposable elements in prokaryotes. *Ann. Rev. Genet.* **15**:341-404.
- Kornberg, A. (1980). DNA Replication. W.H.Freeman and Company, San Francisco.
- Kornblum, J.S., Projan, S.J., Moghazeh, S.L., Novick, R.P. (1988). A rapid method to quantitate non-labeled RNA species in bacterial cells. *Gene* **63**:75-83.
- Krüger, D.H., Schroeder, C. (1981). Bacteriophage T3 and bacteriophage T7 virus-host cell interactions. *Microbiol. Rev.* **45**:9-51.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* **227**:680-284.
- Lang, B.F., Burger, G. (1986). A collection of programs for nucleic acid and protein analysis. Written in Fortran 77 for IBM-PC compatible microcomputers. *Nucl. Acid Res.* **14**:455-465.
- Lau, P.C.K., Spencer, J.H. (1985). Nucleotide sequence and genom organization of bacteriophage S13 DNA. *Gene* **40**:273-284.
- Leduc, M., Kasra, R., Singer, J., Heijenoort van, J. (1984). EDTA induced autolysis in *Escherichia coli* and isolation of resistance mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**:137-142.
- Leduc, M., Heijenoort van, J. (1980). Autolysis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **142**:52-59.
- Lee, N., Inouye, M. (1974). Outer membrane proteins of *Escherichia coli*: Biosynthesis and assembly. *FEBS Lett.* **39**:167-170.
- Lim, L.W., Kennell, D. (1980). Evidence for random endonucleolytic cleavages between messages in decay of *Escherichia coli* trp mRNA. *J. Mol. Biol.* **141**:227-233.
- Looman, A.C., Gruyter de, M., Vogelaar, A., Knippenberg van, P.H. (1985). Effects of heterologous ribosomal binding sites on the transcription and translation of the lacZ gene of *Escherichia coli*. *Gene* **37**:145-154.
- Lubitz, W., Plapp, R. (1980). Murein degradation in *Escherichia coli* infected with bacteriophage PhiX174. *Curr. Microbiol.* **4**:301-304.
- Lubitz, W., Schmid, R., Plapp, R. (1981). Alterations of cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* infected with bacteriophage PhiX174. *Curr. Microbiol.* **5**:45-50.
- Lubitz, W., Halfmann, G., Plapp, R. (1984a). Lysis of *Escherichia coli* after infection with PhiX174 depends on the regulation of the cellular autolytic system. *J. Gen. Microbiol.* **130**:1079-1087.
- Lubitz, W., Harkness, R.E., Ishiguro, E.E. (1984b). Requirement for a functional host cell autolytic system for lysis of *Escherichia coli* by bacteriophage PhiX174. *J. Bacteriol.* **159**:385-387.
- Lubitz, W., Pugsley, A.P. (1985). Changes in cell phospholipid composition of PhiX174 gene E product. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**:171-175.

- Martinez-Salas, E., Vicente, M. (1980). Amber mutation affecting the length of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **144**:532-541.
- Martinez-Salas, E., Vicente, M. (1983). Analysis of the *ilv*-linked genes that determine the morphology of *Escherichia coli* cells. *Curr. Microbiol.* **8**:177-182.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mansfeld van, A.D.M., Teefelen van, H.A.A.M., Zandby, J., Baas, P.D., Jansz, H.S., Veeneman, G.H., Boom van, J.H. (1982). A protein of bacteriophage Φ X174 carries an oligonucleotide which it can transfer to the 3'OH of a DNA chain. *FEBS Lett.* **150**:103-108.
- Maratea, D., Young, K., Young, R. (1985). Deletion and fusion analysis of the phage Φ X174 lysis gene E. *Gene* **40**:39-46.
- Markert, A., Zillig, W. (1965). Studies on lysis of *Escherichia coli* of bacteriophage Φ X174. *J. Virol.* **25**:88-97.
- Marmur, J. (1961). A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* **3**:205-218.
- McMahon, J.E., Tinoco Jr.J. (1978). Sequences and efficiencies of proposed mRNA terminators. *Nature* **271**:275-277.
- Melefors, Ö., van Gabain, A. (1988). Site-specific endonucleolytic cleavages and the regulation of stability of *E. coli* *ompA* mRNA. *Cell* **52**:893-901.
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Morrison, D.A. (1977). Transformation in *Escherichia coli*. Cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**:349-351.
- Morse, D.E., Yanofsky, C. (1969). Polarity and the degradation of mRNA. *Nature* **224**:329-331.
- Mott, J.E., Galloway, J.L., Platt, T. (1985). Maturation of *Escherichia coli* tryptophan operon mRNA: evidence for 3'-exonucleolytic processing after rho-dependent termination. *EMBO J.* **4**:1887-1891.
- Mudd, E.A., Prentki, P., Belin, D., Krisch, H.M. (1988). Processing of unstable bacteriophage T4 gene 32 mRNAs into stable species requires *Escherichia coli* ribonuclease E. *EMBO J.* **7**:3601-3607.
- Müller, U.R., Fitch, W.M. (1981). Theoretical evidence for the significance of certain types of DNA secondary structures in the genome of Φ X174, G4, fd, SV40 and the plasmid pBR322, p.285-297. In: M.S. DuBow (ed.), *Bacteriophage assembly*. Alan R.Liss, Inc., New York.
- Müller, U.R., Fitch, W.M. (1982). Evolutionary selection for perfect hairpin structure in viral DNA's. *Nature* **298**:582-585.
- Müller, U.R., Turnage, M.A. (1986). Insertions of palindromic DNA sequences into the J-F intercistronic region of bacteriophage Φ X174 interfere with normal phage growth. *J. Mol. Biol.* **169**:285-292.
- Neidhardt, F.C., Vaughn, V., Phillips, T.A., Bloch, P.L. (1983). Gene-Protein Index of *Escherichia coli* K12. *Microbiol. Rev.* **47**:231-284.
- Nilsson, G., Belasco, J.G., Cohen, N.S., van Gabain, A. (1984). Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* **312**:75-77.

- Panayotatos, N., Truong, K. (1985). Cleavage within RNaseIII site can control mRNA stability and protein synthesis in vivo. *Nucl. Acids Res.* **13**:2227-2241.
- Pederson, S., Reeth, S., Friesen, J.D. (1978). Functional mRNA half lives in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **176**:39-53.
- Pollock, T.J. (1977). Gene D of Bacteriophage PhiX174: Absence of transcriptional and translational regulatory properties. *J. Virol.* **21**:468-474.
- Pollock, T.J., Tessman, E.S., Tessman, J. (1978). Identification of lysis protein E of bacteriophage PhiX174. *J. Virol.* **28**:408-410.
- Remaut, E., Stanssens, P., Fiers, W. (1981). Plasmid vectors for high efficiency expression controlled by the P_L promoter of Coliphage Lambda. *Gene* **15**:81-93.
- Revet, B., Zarling, D.A., Jovin, T.M., Delain, E. (1984). Different Z-DNA forming sequences are revealed in PhiX174 RFI by high resolution darkfield immuno-electromicroscopy. *EMBO J.* **3**:3353-3358.
- Rich, A., Nordheim, A., Wand, A.H.J. (1984). The chemistry and biology of left handed Z-DNA. *Ann. Rev. Biochem.* **53**:791-846.
- Robertson, H.D. (1982). *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. *Cell* **30**:669-672.
- Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Ematage, J.S., Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A., Eaton, M., Humphreys, G. (1984). Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **12**:6663-6671.
- Ron, E.Z., Zarling, D.A., Jovin, T.M., Delain, E. (1966). Polysomes extracted from *Escherichia coli* by freeze-thaw lysozyme lysis. *Science* **153**:1119-1120.
- Rosenberg, M., Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* **13**:319-353.
- Rüther, U., Koenen, M., Otto, K., Müller-Hill, B. (1981). pUR222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA. *Nucl. Acids Res.* **9**:4087-4098.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison III, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage PhiX174 DNA. *Nature* **265**:687-689.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Friedman, T., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N., Fiddes, J.C., Hutchison III, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M. (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage PhiX174. *J. Mol. Biol.* **125**:225-246.
- Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M., Court, D. (1984). Removal of terminator structure by RNA processing regulates int gene expression. *J. Mol. Biol.* **176**:39-53.
- Schneider, E., Blundell, M., Kennel, D. (1978). Translation and mRNA decay. *MGG* **160**:121-129.
- Schüller, A., Harkness, R.E., Rüther, U., Lubitz, W. (1985). Deletion of C-terminal amino acids codons of PhiX174 gene E: Effect on its lysis inducing properties. *Nucl. Acids Res.* **213**:4243-4153.
- Shank, P.R., Hutchison III, C.A., Edgall, M.H. (1977). Isolation and characterization of the four major proteins in the virion of bacteriophage PhiX174. *Biochem.* **16**:4545-4549.
- Sharp, P.M., Wen-Hsiung, L. (1986). Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for 'rare' codons. *Nucl. Acids Res.* **14**:7737-7749.

- Shimmin, L.C., Vanderwell, D., Harkness, R.E., Curie, A.R., Galloway, A., Ishiguro, E.E. (1984). Temperature sensitive β -Lactam tolerant mutants of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 130:1351-1323.
- Shine, J., Dalgarno, L. (1974). The 3'terminal sequence of *Escherichia coli* 16s ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. USA 75:2741-2745.
- Sinsheimer, R.L. (1959). Purification and properties of bacteriophage PhiX174. J. Mol. Biol. 1:37-42.
- Sinsheimer, R.L. (1968). Bacteriophage PhiX174 and related viruses. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 8:115-169.
- Smith, L.H., Sinsheimer, R.L. (1976). The in vitro transcription units of Bacteriophage PhiX174. I. Characterization of synthetic parameters and measurement of transcript molecular weights. J. Mol. Biol. 103:681-697.
- Smits, M.A., Schoenmakers, J.G., Konings, R.N. (1980). Expression of Bacteriophage M13 DNA in vivo. Eur. J. Biochem. 112:309-321.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- Stanssens, P., Remaut, E., Fiers, W. (1985). Alterations upstream from the Shine Dalgarno region and their effect of bacterial gene expression. Gene 36:211-223.
- Stanssens, P., Remaut, E., Fiers, W. (1986). Inefficient translation initiation causes premature transcription termination in the lacZ gene. Cell 44:711-718.
- Studier, W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNA's and protein on slab gels. J. Mol. Biol. 79:237-248.
- Subbarao, M.N., Kennell, D. (1988). Evidence for endonucleolytic cleavages in decay of lacZ and lacI mRNAs. J. Bacteriol. 170:2860-2865.
- Summers, W.C. (1970). A simple method for extraction of RNA from *Escherichia coli* utilizing diethylpyrocarbonate. Anal. Biochem. 33:459-465.
- Sutcliffe, J.G. (1979). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXIII:77-90.
- Tessman, E.S., Tessman, J. (1973). The genes of the isometric phages. In: The single stranded DNA phages. (Ed: Denhardt, D.T., Dressler, D., Ray, D.S.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York pp.9-29.
- Tinoco, J., Boer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M., Gralla, J. (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nature 246:40-41.
- Tormo, A., Martinez-Salas, E., Vicente, M. (1980). Involvement of the ftsZ gene product in late stages of the *Escherichia coli* cell cycle. J. Bacteriol. 141:806-813.
- Tormo, A., Fernandez-Cabrera, C., Vicente, M. (1985). The ftsZ gene product: a possible connection between DNA replication and septum in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. 131:239-244.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:4350-4354.

- Van Gabain, A., Belasco, J.G., Schottel, J.L., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.** (1983). Decay of mRNA in *Escherichia coli*: Investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:653-657.
- Wadle, D., Heinrich, B., Plapp, R.** (1986). Effects of mutations in genes *fadR*, *fadB*, *fadE* and *envC* of *Escherichia coli* on the action of the lysis gene of bacteriophage *PhiX174*. *Curr. Microbiol.* **14**:65-69.
- Wells, R.D., Goodman, T.C., Hillen, W., Horn, G.T., Klein, R.D., Larson, J. E., Müller, U.R., Neuendorf, S.K., Panyotatos, N., Stirdivant, S.M.** (1980). DNA structure and gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **42**:167-267.
- Wickner, W.T., Lodish, H.F.** (1985). Multiple mechanism of protein insertion into and across membranes. *Science* **230**:400-407.
- Witte, A.**(1985). Physiologische Untersuchungen zur Infektion und Lyse von *Escherichia coli* durch den Bakteriophagen *PhiX174*. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Witte, A., Lubitz, W., Bakker, E.P.** (1987). Proton-motive-force-dependent step in the pathway to lysis of *Escherichia coli* induced by bacteriophage *PhiX174* gene E product. *J. Bacteriol.* **169**:1750-1720
- Witte, A., Lubitz, W.** (1988). Biochemical characterization of *PhiX174* protein E mediated lysis of *Escherichia coli*. *Euro. J. Biochem.* in press
- Wong, H.C., Chang, S.** (1986). Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNA in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:3233-3237.
- Wright, J.J., Hayward, R.S.** (1987). Transcriptional termination at a fully rho-independent site in *Escherichia coli* is prevented by uninterrupted translation of the nascent RNA. *EMBO J.* **6**:1115-1119.
- Yansura, D.G., Henner, D.J.** (1984). Use of the *Escherichia coli* lac repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:439-443.
- Young, K.D., Young, R.** (1982). Lytic action of cloned *PhiX174* gene. *J. Virol.* **44**:993-1002.

Anhang

1. Mögliche intramolekulare Basenpaarungen auf der PhiX174 mRNA XIII nach Algorithmen von Lang und Burger (1986).
 Angegeben sind die gepaarten Basen auf der PhiX174 mRNAXIII-Sequenz und die resultierende Bindungsenergie

(27) energy : -12.0kcal 27-AGGUA-32 411-UCCAUU-406	(106) energy : -12.6kcal 106-CUUCUC-112 456-GAAGAG-450	(243) energy : -16.3kcal 243-CCUCGC-248 555-GAAGCG-550
(33) energy : -12.3kcal 33-GAAUACU-40 140-CUUUAGUA-133	(111) energy : -12.1kcal 111-GCCG-114 529-CGCG-526	(246) energy : -17.0kcal 246-CGCUUCC-253 339-GCGGAAG-332
(57) energy : -12.0kcal 57-CAAUCC-62 171-GUUAGG-166	(122) energy : -16.6kcal 122-UUUUACCG-129 385-AAUUGGC-379	(249) energy : -16.5kcal 249-UUUCUUC-256 430-AAAGGACG-423
(60) energy : -21.3kcal 60-UCCGUACGU-65 484-AGCGUGCA-476	(126) energy : -17.6kcal 126-ACCGAAGUA-136 590-UGUUUUCUCU-580	(252) energy : -12.0kcal 252-CCUUC-256 620-GGACG-616
(60-2) energy : -15.1kcal 60-UCCGUA-65 352-AGGCAU-347	(127) energy : -14.5kcal 127-CCGAA-132 628-GGCUUC-623	(255) energy : -14.6kcal 255-GCUCCU-261 623-CGGGAC-617
(62) energy : -16.6kcal 62-CGUACGUUU-70 468-GCUGGAAA-458	(149) energy : -12.7kcal 149-GACGAG-154 584-CUCUC-579	(276) energy : -14.2kcal 276-GCCGU-280 319-CGCA-315
(74) energy : -13.2kcal 74-GACCGCUU-81 602-CUGGGA-595	(157) energy : -13.0kcal 157-ACAAAGUUUG-167 235-UUUUACGUUC-225	(276-2) energy : -12.1kcal 276-GCCG-279 529-CGCG-526
(76) energy : -12.1kcal 76-CCGC-79 483-GGCG-480	(176) energy : -13.7kcal 176-UGACCG-182 603-ACUGGU-597	(278) energy : -12.0kcal 278-CGUAUU-284 369-GCGUAA-363
(78) energy : -14.2kcal 78-GCUUUGGC-86 386-CGAAAUUG-380	(179) energy : -12.1kcal 179-CCGC-182 483-GCG-480	(314) energy : -15.4kcal 314-AACGC-319 549-UUGCG-544
(83) energy : -12.6kcal 83-GGCG-86 530-CGCG-527	(186) energy : -14.5kcal 186-GCUGCG-201 545-CAGCG-540	(315) energy : -13.6kcal 315-ACGGC-320 538-UGCUG-533
(84) energy : -12.5kcal 84-GCCUCU-89 623-CGCGA-618	(197) energy : -13.6kcal 197-CUGCG-202 453-GACGA-448	(316) energy : -12.1kcal 316-CGCG-319 390-GCCG-387
(102) energy : -12.0kcal 102-CAGCG-106 322-GUCCG-318	(223) energy : -12.3kcal 223-CGUGGA-229 524-GCGUCU-518	(317) energy : -12.6kcal 317-GCCG-320 630-CGCG-627
(103) energy : -14.7kcal 103-AGCUCUCG-112 625-UUCGGGACG-616	(236) energy : -13.5kcal 236-GGAU-240 302-CCCUA-298	(366) energy : -12.1kcal 366-GGCG-366 530-CGCG-527

(371) energy : -18.4kcal

371-CGAGCGUC-378

528-GCUCGCG-521

(528) energy : -12.8kcal

528-GCCG-531

623-CGGG-620

(371-2) energy : -18.4kcal

371-CGAGCGUC-378

582-GCUCGCG-575

(544) energy : -12.1kcal

544-GCCG-547

629-CGGG-626

(372) energy : -12.2kcal

372-GAGCGUC-378

441-CUUGCA-435

(556) energy : -12.8kcal

556-UACUAAAGG-565

591-AUGGUUUCUG-582

(387) energy : -12.1kcal

387-GCCG-390

629-CGGG-626

(388) energy : -12.1kcal

388-CGGG-391

483-GCCG-480

(401) energy : -18.7kcal

401-CGCGU-405

423-GCGCA-419

(405) energy : -14.4kcal

405-UUUUACCUU-412

511-AUUUUAAA-504

(407) energy : -15.4kcal

407-UACCUUGC-414

557-AUGGAGCG-550

(419) energy : -12.0kcal

419-ACGCGC-424

467-UCCGUG-462

(446) energy : -15.7kcal

446-UGAGGCA-452

469-ACUGCGU-463

(461) energy : -13.6kcal

461-CGUGCGU-467

482-GCGUGCA-476

(464) energy : -12.0kcal

464-GCGUCA-469

525-CGCGGU-520

(479) energy : -16.3kcal

479-UGCGGA-484

543-ACGCGU-538

(527) energy : -12.1kcal

527-GCGC-530

578-GCGG-575

2. Mögliche intramolekulare Basenpaarungen auf dem PL-GenD/E-Transkript von Plasmid pSB35 nach Algorithmen von Lang und Burger (1986).
 Angegeben sind die gepaarten Basen auf der PL-GenD/E-mRNA-Sequenz und die resultierende Bindungsenergie.

(2) energy : -18.9kcal 2-UCAGCAQA-10 355-AUUGUCCU-377	(58) energy : -12.8kcal 58-AAGCG-62 754-UUCCG-750	(177) energy : -12.0kcal 177-CAUCC-182 291-GUUAG-286
(6) energy : -12.2kcal 6-CAGGACG-12 941-GUCUUGC-935	(59) energy : -14.7kcal 59-AGGCG-63 652-UCCCG-648	(180-2) energy : -15.1kcal 180-UCCGUA-185 472-AGGCAU-467
(8-2) energy : -13.3kcal 8-GGACG-12 660-CCUGC-656	(81-2) energy : -12.0kcal 81-GGCAQ-85 233-CCGUC-228	(180) energy : -21.3kcal 180-UCCGUAU-185 604-AGGCGUGCA-596
(8) energy : -16.3kcal 8-GGACGC-13 499-CCUGCG-494	(81) energy : -17.1kcal 81-GGACGA-67 386-CCGUCGU-392	(182) energy : -16.8kcal 182-CGUACGUUU-190 586-GCGUGGAAA-376
(9) energy : -15.7kcal 9-GAGCGAC-15 588-CUGCGUG-582	(74) energy : -12.6kcal 74-GCAQAQ-80 232-CGUCUUC-226	(184) energy : -13.2kcal 184-GACCGCUU-201 722-CUGGUGQA-715
(18) energy : -20.1kcal 18-UGAGCACC-23 723-ACUGUGG-716	(80) energy : -12.3kcal 80-GGCUUU-85 509-CCGAAA-504	(196) energy : -12.1kcal 196-CCGC-198 803-GGCG-800
(22) energy : -12.8kcal 22-CCAUQA-27 653-GGUACU-448	(86) energy : -13.3kcal 86-GGGGU-81 422-CCUAC-417	(186) energy : -14.2kcal 186-GCUUGGCC-206 508-CGAAUUGG-500
(31) energy : -13.6kcal 31-UGAGCG-36 589-ACUGCG-584	(87) energy : -12.3kcal 87-GGUGU-82 364-CCGUA-359	(203) energy : -12.6kcal 203-GGCG-206 750-CCG-747
(32) energy : -15.7kcal 32-GAGCGUC-38 498-CUGGAG-492	(87-2) energy : -12.2kcal 87-GGUG-81 851-CCGCG-847	(204) energy : -12.5kcal 204-GCCUCU-209 743-CGGGA-738
(47) energy : -15.8kcal 47-AAGCGG-52 745-UUCGG-740	(104) energy : -12.7kcal 104-CGAAGC-109 747-GCUUCG-742	(222) energy : -12.0kcal 222-CAGCG-226 442-GUCCG-438
(48) energy : -14.7kcal 48-GCCGU-53 63-CGGGA-59	(107) energy : -18.1kcal 107-AGCAUUGGAUU-117 132-UCGAGCCUGA-122	(228) energy : -14.7kcal 228-AGGCUUCUGC-232 745-UUCGGGAGC-736
(50) energy : -14.8kcal 50-CCGUAAQ-57 89-GGGGUUC-82	(147) energy : -12.0kcal 147-AGGUAA-152 531-UCCAUU-526	(226) energy : -12.6kcal 226-CUUCUGC-232 576-GAGUUCU-570
(51) energy : -12.3kcal 51-CCUGAA-56 225-GGACUU-220	(153) energy : -12.3kcal 153-GAAUUCAU-160 260-CUUUAGA-253	(231) energy : -12.1kcal 231-GCGG-234 749-CGCG-748

(242) energy : -16.6kcal
242-UUUUACCG-249
506-AAAUUGGC-489

(246) energy : -17.8kcal
246-ACCGAAGAUGA-256
710-UGGUUUCUGU-700

(247) energy : -14.5kcal
247-CCGAAG-252
748-GGCUUC-743

(268) energy : -12.7kcal
268-GACGAG-274
704-CUGCUC-699

(277) energy : -13.0kcal
277-ACAAAGUUUGG-287
355-UGUUUCAAGUC-345

(296) energy : -13.7kcal
296-UGACCGC-302
723-ACUGGUU-717

(299) energy : -12.1kcal
299-CCGC-302
603-GCG-600

(316) energy : -14.5kcal
316-GCUCG-321
665-GUAGCG-660

(317) energy : -13.6kcal
317-CUUGU-322
573-GACGCA-568

(343) energy : -12.3kcal
343-CGUGGA-349
644-GCGUCU-638

(356) energy : -13.5kcal
356-GGCU-360
422-CCUA-418

(363) energy : -16.3kcal
363-CCUCC-368
675-GUAGCG-670

(366) energy : -17.0kcal
366-CCCUUCC-373
458-CCGGAAG-452

(369) energy : -16.5kcal
369-UUUCUUC-376
550-AAUGAGC-543

(372) energy : -12.0kcal
372-CCUG-376
740-GGAG-736

(375) energy : -14.8kcal
375-CCUCCU-381
743-CGGGAC-737

(396) energy : -14.2kcal
396-CCGU-400
439-CGCA-435

(396-2) energy : -12.1kcal
396-CCG-399
749-CGCG-746

(398) energy : -12.0kcal
398-CGUAU-404
489-CCGUAA-483

(434) energy : -15.4kcal
434-AACGC-438
669-UUGCC-664

(435) energy : -13.8kcal
435-ACGCC-440
658-UGCUU-653

(436) energy : -12.1kcal
436-CCGC-438
510-GCG-507

(437) energy : -12.6kcal
437-GGCC-440
750-CCCG-747

(486) energy : -12.1kcal
486-GCG-488
650-CCGC-647

(491-2) energy : -18.4kcal
491-CGAGCUC-498
702-GCUCGCG-695

(491) energy : -16.4kcal
491-CGAGCUC-498
648-CCUCCCG-641

(492) energy : -12.2kcal
492-GAGCUC-498
561-CUAGCA-555

(507) energy : -12.1kcal
507-GCCG-510
749-CGCG-746

(508) energy : -12.1kcal
508-CCGC-511
603-GCG-600

(521) energy : -13.7kcal
521-CGCU-525
543-GGCA-539

(525) energy : -14.4kcal
525-UUUACCU-532
631-AAAUAGAA-624

(527) energy : -15.4kcal
527-UACCUUC-534
677-AUGAGCG-670

(539) energy : -12.0kcal
539-ACGCG-544
587-UCCUG-582

(566) energy : -15.7kcal
566-UGAGCA-572
589-ACUGCU-583

(581) energy : -13.6kcal
581-CGUUGU-587
602-GGUGCA-598

(584) energy : -12.0kcal
584-GGUGCA-589
645-CGCGU-640

(599) energy : -16.3kcal
599-UCCGA-604
663-ACCCU-658

(647) energy : -12.1kcal
647-CGCC-650
698-GCG-695

(648) energy : -12.6kcal
648-GCCC-651
743-CGCG-740

(664) energy : -12.1kcal
664-GCC-667
749-CGCG-746

(676) energy : -12.6kcal
676-UACUAAAGCG-685
711-AUGUUUCU-702

3. A. Mögliche intramolekulare Basenpaarungen auf dem PL_{GenD/E}-Transkript von Plasmid pSB35 nach Algorithmen von Tinoco et al. (1973).
 Angegeben sind die gepaarten Basen auf der PL_{GenD/E}-mRNA-Sequenz und die resultierende Bindungsenergie.

9/12 0.75 -7.0	129 68	ATGCTG TACGACGGGAAG	TTC ***	137 57	6/6 1.00 -6.0	311 275	CTCGTC GAGCAG	316 270
6/6 1.00 -0.6	153 121	AGAAAT TCTTTA	158 116		7/7 1.00 -3.2	350 284	ACTTTGT TGAACA	356 278
9/11 0.82 -3.2	174 138	TGAACA ACTTGTCGTAG	ATC **	182 128	6/6 1.00 -2.0	425 386	TCAACA AGTTGT	430 381
6/6 1.00 -4.0	187 105	CGTTTC GCAAAG	192 100		13/17 0.76 -13.8	584 573	TGCGTCAAAAATTACGT ACGCAGTCATTCTTGCA	600 557
							** **	
6/6 1.00 -2.8	209 149	CTATTA GATAAT	214 144		8/8 1.00 -6.8	625 533	AAGGTAAA TTCCATTT	632 526
8/8 1.00 -4.6	254 161	ATGATTTC TACTAAAG	261 154		9/11 0.82 -13.2	659 605	TCCGCAGCCGT AGGCGT GCA	669 597
							**	
6/6 1.00 -1.6	274 174	AGTAAC TCATTG	279 169					

3.B. Mögliche intramolekulare Basenpaarungen auf der PhiX174mRNA XIII nach Algorithmen von Tinoco et al. (1973).
 Angegeben sind die gepaarten Basen auf der PhiX174 mRNA XIII-Sequenz und die resultierende Bindungsenergie

9/11 0.82 -3.2	53 17	UGAACA AUC ACUUGUCGUAG **	61 7	6/6 1.00 -2.0	304 265	UCAACA AGUUGU	309 260	
6/6 1.00 -2.8	88 28	CUAUUA 93 GAUAAU 23		13/17 0.76 -13.8	463 452	UGCGUCAAAAAUUACGU ACGCAGUCAUUCUUGCA ** **	479 436	
8/8 1.00 -4.6	133 40	AUGAUUUC 140 UACUAAAG 33		8/8 1.00 -6.8	504 412	AAGGUAAA UUCCAUUU	511 405	
6/6 1.00 -1.6	153 53	AGUAAAC 158 UCAUUG 48		6/6 1.00 -11.6	540 524	CGCCAG GCGGUC	545 519	
6/6 1.00 -6.0	190 154	CUCGUC 195 GAGCAG 149		8/10 0.80 -13.6	575 532	AGGGCGCUCG UCCGCGUCGC **	584 523	
7/7 1.00 -3.2	229 163	ACUUUGU 235 UGAAACA 157						

4.A. Homologievergleich einer spezifischen Endonuklease-Erkennungssequenz auf dem lac Operon bei Nukleotid 4347-4356 (Ende lacZ Gen) mit der PhiX174 Sequenz.
 In der Diskussion wurde die Sequenz 5'TGTCAAAAAT 3' mit lac₅₅als Abkürzung bezeichnet.

9/9	1	TGTCAAAAA	9
1.00	209	TGTCAAAAA	217
6/6	1	TGTCAA	6
1.00	2589	TGTCAA	2594
9/9	2	GTCAAAAAT	10
1.00	817	GTCAAAAAT	825
8/8	2	GTCAAAAAA	9
1.00	3004	GTCAAAAAA	3011
7/7	3	TCAAAAAA	9
1.00	1497	TCAAAAAA	1503
7/7	3	TCAAAAAA	9
1.00	3380	TCAAAAAA	3386
7/7	3	TCAAAAAA	9
1.00	3446	TCAAAAAA	3452
6/6	4	CAAAAAA	9
1.00	4445	CAAAAAA	4450
6/6	5	AAAAAAT	10
1.00	59	AAAAAAT	64
6/6	5	AAAAAAT	10
1.00	2322	AAAAAAT	2327
6/6	5	AAAAAAT	10
1.00	4345	AAAAAAT	4350

4.B. Homologievergleich einer spezifischen Endonuklease-Erkennungssequenz auf dem lac Operon bei Nukleotid 4347-4356 (Ende LacZ Gen) mit der P_{L-GenD/E} mRNA vom Plasmid pSB35.
 In der Diskussion wurde die Sequenz 5'TGTCAAAAAT 3' mit lac₅₅ als Abkürzung bezeichnet

9/9	2	GTCAAAAAT	10
1.00	587	GTCAAAAAT	595

5.A

Homologievergleicheiner spezifischen Endonuklease-Erkennungssequenz auf dem lac- Operon bei Nukleotid 4544-4563 (lacZ Gen) mit der PhIX174 Sequenz.

In der Diskussion wurde die Sequenz 5' GGGTATTATTTTGGCCGCTA 3' mit lac240 als Abkürzung bezeichnet.

11/14 0.79	2 2952	GGTATTATTTTGC GGTATTGCTTCTGC ** *	15 2965	6/6 1.00	7 2521	TATTTT TATTTT	12 2526
7/7 1.00	2 3081	GGTATTA GGTATTA	8 3087	6/6 1.00	7 3654	TATTTT TATTTT	12 3659
6/6 1.00	2 3828	GGTATT GGTATT	7 3833	7/7 1.00	7 3818	TATTTTTT TATTTTTT	13 3824
6/6 1.00	2 3888	GGTATT GGTATT	7 3893	6/6 1.00	7 4647	TATTTT TATTTT	12 4652
7/7 1.00	2 4455	GGTATTA GGTATTA	8 4461	8/8 1.00	7 4725	TATTTTTG TATTTTTG	14 4732
8/9 0.89	4 639	TATTATTTT TATTATGTT *	12 647	6/6 1.00	8 1199	ATTTTT ATTTTT	13 1204
6/6 1.00	4 2752	TATTAT TATTAT	9 2757	12/12 1.00	8 2332	ATTTTTGCCGCT ATTTTTGCCGCT	19 2343
6/6 1.00	4 3566	TATTAT TATTAT	9 3571	9/10 0.90	8 2652	ATTTTT GCC ATTTTTTGCC *	16 2661
10/13 0.77	5 708	ATTATTTTTGCCG ATTATTAATGGCG ** *	17 720	9/10 0.90	9 4383	TTTTTGCCGC TTTT GCCGC *	18 4391
7/7 1.00	5 2896	ATTATTT ATTATTT	11 2902	9/11 0.82	9 4576	TTTTTGCCGCT TTTTTGACACT * *	19 4586
8/8 1.00	5 4018	ATTATTTT ATTATTTT	12 4025	9/10 0.90	11 2842	TTTGCCGCTA TTTACCGCTA *	20 2851
6/6 1.00	6 1381	TTATTT TTATTT	11 1386	7/7 1.00	12 1970	TTGCCGC TTGCCGC	18 1976
7/8 0.88	6 1656	TTATTTTT TTATTTCT *	13 1663	6/6 1.00	12 3424	TTGCCG TTGCCG	17 3429
6/6 1.00	6 2408	TTATTT TTATTT	11 2413	8/9 0.89	12 3844	TTGCCGCTA TTGCCGATA *	20 3852
6/6 1.00	7 1403	TATTTT TATTTT	12 1408	6/6 1.00	13 1032	TGCCGC TGCCGC	18 1037

5.B. Homologievergleich einer spezifischen Endonuklease-Erkennungssequenz auf dem lac Operon bei Nukleotid 4544-4563 (lacZ Gen) mit der P_L-GenD/E mRNA vom Plasmid pSB35.

In der Diskussion wurde die Sequenz 5'GGGTATTATTTTGCCGCTA 3' mit lac₂₄₀ als Abkürzung bezeichnet.

8/9	4	TATTATTTT	12
0.89	409	TATTATGTT	417
		*	
10/13	5	ATTATTTTGTCCG	17
0.77	478	ATTATTAATGGCG	490
		** *	
6/6	14	GCCGCT	19
1.00	508	GCCGCT	513

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie, Universität Kaiserslautern, begonnen und im Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München sowie im Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Wien fortgeführt.

Mein besonders herzlicher Dank gilt:

- vor allem Herrn Prof. Dr. Werner Lubitz, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde, für seine hilfreichen Anregungen, seine Bereitschaft zu intensiver Diskussion und seine äußerst großzügige Unterstützung.
- Frau Angela Witte, Herrn Dr. Udo Bläsi und Herrn Dr. Robin Harkness für Ihre zahlreichen Hinweise, Ihre gute Zusammenarbeit und ständige Hilfsbereitschaft.
- Herrn Prof. Dr. Horst Schmieger und seiner Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und viele Anregungen.
- Herrn Dr. Bernhard Henrich, Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern und Herrn Dr. Udo Bläsi, zur Zeit Dept. of Biochemistry and Biophysics, Texas University, für die Überlassung der Plasmide.
- Herrn Prof. Dr. Plapp, Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern, für seine Anregungen und Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
- Prof. Dr. E. E. Ishiguro, Dept. of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria, Canada.

Allen meinen Freunden und Kollegen im Institut für Mikrobiologie, Universität Kaiserslautern, im Institut für Genetik und Mikrobiologie, LMU München, und im Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Wien, möchte ich für zahlreiche Hinweise und gute Zusammenarbeit danken.

Curriculum vitae

Geburtsdatum: 10.01.1958

Geburtsort: Otterbach

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

1955-1968 Grundschule Kaiserslautern

1968-1977 Staatliches Gymnasium an der Burgstraße in Kaiserslautern

1977-1983 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Humangenetik, Botanik,
Organische Chemie.
Diplomarbeit bei Prof.Dr. Lubitz

1984 Beginn der Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Lubitz im Institut für
Mikrobiologie der Universität Kaiserslautern

1985 Wechsel der Arbeitsgruppe an das Institut für Genetik und Mikrobiologie
der Universität München, Weiterführung der Arbeiten

1987 Wechsel der Arbeitsgruppe an das Institut für Mikrobiologie und Genetik
der Universität Wien, Weiterführung der Arbeiten und Tätigkeit als
wissenschaftliche Assistentin

